



MARINA THEMOTEO VARELA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE
ALQUILFENÓIS SUBSTITUÍDOS EM *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Orientador:

Prof. Dr. João Paulo dos Santos
Fernandes

Diadema

2018

Varela, M. T.

Síntese E Avaliação Da Atividade De Alquilfenóis Substituídos Em *Trypanosoma Cruzii* Marina Themoteo Varela.
- - Diadema, 2018.

168 f.

Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2018.

Orientador: João Paulo dos Santos Fernandes

1. Compostos antiparasitários. 2. Doença de Chagas 3. *Trypanosoma cruzi*. 4. Protótipos Naturais 5. Modificações Moleculares. I. Título.

CDD 615.884

LISTA DE ABREVIATURAS

NTD: *Neglected Tropical Diseases* (Doenças Tropicais Negligenciadas)

WHO: *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

HIV: *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

AIDS: *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

P&D: Pesquisa e Desenvolvimento

DC: Doença de Chagas

TCT: tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

TCA: amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

IgG: Imunoglobulina G

CI₅₀: Concentração inibitória para 50% de uma população

CE₅₀: Concentração efetiva para 50% de uma população

CC₅₀: Concentração citotóxica para 50% de uma população de células saudáveis

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

CG: Cromatografia Gasosa

EMBR: Espectro de Massa de Baixa Resolução

EI: *Electronic Impact* (impacto eletrônico)

STAB: *Sodium Triacetoxyborohydride* (triacetóxi-boroidreto de sódio)

SFB: Soro Fetal Bovino

DMSO: dimetilssulfóxido

PCA: *Principal Component Analysis* (Análise de Componentes Principais)

HCA: *Hierarchical Cluster Analysis* (Análise de Agrupamento Hierárquico)

IS: Índice de Seletividade

GE: *Group Efficiency* (Eficiência de Grupo)

REA: Relação Estrutura-Atividade

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de São Paulo, por me proporcionar a oportunidade de obter o meu diploma de Bacharel em Farmácia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que me permitiu desenvolver esse trabalho. Aos professores que fizeram parte da minha graduação e mestrado, que ajudaram a construir o meu conhecimento acadêmico e também despertaram o interesse em seguir essa carreira.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro através de bolsa de mestrado concedida (Processo 2016/00195-4).

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Paulo dos Santos Fernandes, por ter depositado em mim a sua confiança para realizar esse projeto, desde a minha Iniciação Científica. Obrigado por sempre estar presente e disponível para os seus alunos, sendo um amigo além de tudo.

Ao Prof. Dr. João Henrique Lago, pela contribuição com os produtos naturais que deram origem a este projeto. Ao Prof. Dr. André Tempone e seus alunos pela realização dos ensaios biológicos. A Profa. Dra. Daniela Rando, presente desde os dias de graduação, por se dispor a passar um pouco dos seus conhecimentos em modelagem molecular. Aos demais professores do Laboratório LINS por serem sempre receptivos e ajudarem em momentos de dúvida e questionamento.

A toda a minha família que sempre apoiou as minhas escolhas e sempre estiveram ao meu lado nos momentos de dúvida e dificuldades, sendo ombros amigos quando necessário, e sempre demonstrando orgulho a cada vitória alcançada. Especialmente à minha mãe, Christina, por sempre ouvir quando eu precisava desabafar e estava ali para me aconselhar e falar que tudo ia se acertar. Obrigada por ser a minha luz.

Aos meus amigos, da faculdade, do laboratório, da vida, obrigada por fazerem parte e ajudarem a construir a minha história. A presença de cada um de vocês nessa jornada com certeza teve um impacto em quem eu sou hoje. Obrigada pelas palavras e pelos ensinamentos que cada um, da sua forma, me passou.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. Doença de Chagas	14
2.2. Produtos Naturais como Protótipos	23
3. OBJETIVOS	31
4. METODOLOGIA	33
4.1. Rota Sintética	34
4.2. Síntese dos compostos	36
4.2.1. Iminas	36
4.2.2. Aminas	37
Metodologia 1	37
Metodologia 2	37
Metodologia 3	38
4.2.3. Compostos α,β -Insaturados	39
Metodologia 1	39
Metodologia 2	40
Metodologia 3	41
4.2.4. Compostos Hidroxilados	41
Metodologia 1	41
Metodologia 2	42
4.2.5. Amidas	43
Metodologia 1	43
Metodologia 2	44
Metodologia 3	44
4.2.6. Ésteres	45
Metodologia 1	45
Metodologia 2	45
Metodologia 3	46
Metodologia 4	47
4.3. Parasitas e células	47
4.4. Avaliação da eficácia <i>in vitro</i> em <i>T. cruzi</i>	48
4.5. Determinação da citotoxicidade <i>in vitro</i> e índice de seletividade	49

4.6.	Ensaio de alteração de permeabilidade da membrana plasmática	49
4.7.	Estudos de Relação Estrutura Atividade	49
4.7.1.	<i>Cálculo de Eficiência de Grupos</i>	50
4.7.2.	<i>Cálculo de Descritores Moleculares</i>	50
4.7.3.	<i>Análise Exploratória de Dados</i>	51
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1.	Síntese e Caracterização dos Compostos	52
5.2.	Atividade Antiparasitária e Citotoxicidade	75
5.3.	Avaliação da Atividade Perturbadora da Membrana Celular	81
5.4.	Estudos de Relação Estrutura-Atividade	84
	CONCLUSÕES	97
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
	APÊNDICE	114
	ANEXOS	166

RESUMO

Neste trabalho os produtos naturais gibilimbol A e B isolados de *Piper malacophyllum* foram utilizados como protótipos para o desenvolvimento de análogos estruturais devido à sua promissora atividade antiparasitária e baixa citotoxicidade. Inicialmente foi proposta a adição de grupos funcionais na cadeia lateral com a manutenção do anel fenólico e os resultados mostraram que de fato há um incremento na atividade, assim como a citotoxicidade. Uma hipótese levantada foi que a presença do fenol poderia estar associada à toxicidade desses análogos e, assim, a nova série proposta tem como objetivo estudar a importância da hidroxila fenólica e do oxigênio na posição *para* do anel, substituindo a hidroxila por metoxila ou hidrogênio. Além disso, foram propostos análogos com dois substituintes, um em *meta* e um em *para* no anel, de forma a estudar como isso afeta a atividade e citotoxicidade. Foram sintetizados e testados 18 análogos. Os resultados mostraram que as aminas secundárias monosubstituídas, são os mais ativos da série contra ambas as formas do parasita e que a presença do anel metoxibenzênico leva a uma menor citotoxicidade e atividade biológica, quando comparado com os demais padrões de substituição testados. Ainda, dentre os demais análogos neutros, os ésteres dissustituídos apresentaram atividades menores que 10 µM para a forma replicativa do parasita e seletividade mais de 20 vezes maior por essas células em comparação com as mamíferas.

Palavras-Chave: Compostos antitripanosoma, doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, protótipos naturais, modificações moleculares.

ABSTRACT

In this work the natural products gibbilimbol A and B isolated from *Piper malacophyllum* were used as prototypes for the development of structural analogues given their promising anti-*Trypanosoma cruzi* activity and low cytotoxicity. Initially, the addition of functional groups in the side chain of the phenol ring led to an increased antiparasitic activity as well as cytotoxicity. One hypothesis raised was that the cytotoxicity was associated with the presence of the phenol ring in these analogues. So, the new series proposed aims to study the importance of the phenols' hydroxyl group and the oxygen atom in the *para* position of the ring, replacing it for a methoxy group or a hydrogen atom. Furthermore, disubstituted analogues, in *meta* and *para* positions, were proposed in order to evaluate how this would affect the activity and cytotoxicity. 18 analogues were synthesized and tested. Results showed that the monosubstituted amines were the most active in the series against both forms of the parasite and that the presence of the methoxybenzenic ring leads to a higher activity and lower cytotoxicity, when compared to other substitution patterns tested. Moreover, among the neutral analogues, disubstituted analogues showed activities lower than 10 μ M for the replicative form of the parasite and a 20 fold selectivity index compared to mammalian cells.

Keywords: Antitrypanosoma compounds, Chagas' disease, *Trypanosoma cruzi*, natural prototypes, molecular modifications.

1. INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (NTDs) são assim classificadas pela Organização Mundial da Saúde (WHO) e compreendem 17 patologias que afetam humanos e animais e estão distribuídas em 149 países, tropicais e subtropicais principalmente. Dentre esses, os mais afetados pelas NTDs são Brasil, China, Índia, Indonésia e Nigéria (BANGERT et al., 2017).

Usualmente, são doenças crônicas associadas a altas taxas de mortalidade e morbidade caracterizando um grande impacto socioeconômico (MOLYNEUX, 2013). Estima-se que mais de um bilhão de pessoas estejam infectadas com uma ou mais NTDs atualmente, sendo a maioria desses habitantes de regiões pobres, com saneamento básico inadequado e dificuldade de acesso ao sistema de saúde (EZZAT et al., 2016).

O investimento em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) para essas doenças é muito baixo, sendo ainda muito concentrado na malária, tuberculose e HIV/AIDS. Um estudo publicado em 2009 mostrou que do total de 2,5 bilhões de dólares investidos em pesquisa para doenças negligenciadas em 2007 mais de 75% desse montante foi dividido entre essas três patologias (MORAN et al., 2009). Outro dado importante é que entre os anos 1975 e 2004, dos 1.556 novos medicamentos desenvolvidos, apenas 18 foram para doenças tropicais (CHIRAC, TORREELE, 2006).

Dentre as principais NTDs, pode-se destacar a doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanosomíase americana, que é uma infecção parasitária causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado da família dos Tripanosomatídeos. A principal forma de infecção é dependente de um vetor, o *Triatoma infestans*. Entretanto, também pode ser contraída de forma não-vetorial, como por transfusão sanguínea,

transplante de órgãos, verticalmente e pelo consumo de alimentos contaminados (CHATELAIN, 2015).

A prevalência mundial da DC é de cerca de 8 milhões de pessoas e é responsável pelo óbito de aproximadamente 7 mil pacientes por ano, sendo a infecção parasitária com maior taxa de mortalidade na América Latina, a principal região endêmica (WHO, 2015). Os efeitos crônicos da DC fazem dela a principal causa de cardiomiopatia infecciosa no mundo, aumentando o fardo mundial de pacientes com doenças cardiovasculares (CHATELAIN, 2015). Ainda assim, é uma das doenças mais negligenciadas, com um custo global associado à patologia estimado entre 7 e 19 bilhões de dólares anualmente e é uma das principais causas de morbidade e mortalidade nos países latino-americanos (RASSI *et al.*, 2007; ZINGALES *et al.*, 2014; OTTILIE *et al.*, 2017).

Apenas dois fármacos foram aprovados desde o seu descobrimento como opções de tratamento, os nitrocompostos nifurtimox e o benznidazol, sendo este último o fármaco de primeira escolha e o único disponível no Brasil. O objetivo da terapia é suprimir a infecção ou impedir o desenvolvimento do parasita no organismo hospedeiro, eliminando-o da corrente sanguínea, linfática e dos tecidos, embora a eliminação completa do parasita do organismo seja difícil na fase crônica. Esses fármacos estão associados a significativos efeitos adversos, sendo os mais relatados a perda de peso, sintomas gastrointestinais diversos e alergias, que tendem a progredir com o aumento da dose e o período prolongado de tratamento (PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2015). Estudos clínicos mostram que a eficácia desses compostos, em associação ou separados, levam a cura de 80% dos pacientes tratados na fase aguda, enquanto que apenas 5 a 20% dos pacientes infectados são curados na fase crônica (RAJÃO *et al.*, 2014; CHATELAIN, 2015). Isso reforça a carência de novas moléculas, com mecanismos de ação diferentes

mais eficazes, inclusive contra cepas resistentes, que possam chegar à fase de ensaios pré-clínicos e clínicos (BERMUDEZ *et al.*, 2016).

Dentre as diversas formas de encontrar compostos promissores, pode ser destacada a triagem de produtos naturais, muitas vezes com uma atividade já popularmente conhecida para dadas doenças. Uma série de trabalhos recentes vem mostrando moléculas, muitas delas bastante simples, que apresentaram resultados interessantes para serem protótipos no desenvolvimento de fármacos através de modificações moleculares (FLORES *et al.*, 2009; GRECCO *et al.*, 2012; RAMÍREZ-MACÍAS *et al.*, 2012; VEIGA-SANTOS *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2016; VARELA *et al.*, 2016). Entre eles, o gibilimbol B, um alquilfenol isolado das folhas de pariparoba-murta (*Piper malacophyllum*), apresentou promissora atividade antiparasitária em cepas de *T. cruzi* e *Leishmania infantum*, com importante seletividade para esses parasitas em comparação com células mamíferas. Além disso, esse produto natural apresenta a capacidade de alterar a permeabilidade da membrana plasmática, o que poderia ser visto como um possível mecanismo de ação (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Em 2016, nosso grupo publicou um trabalho relatando a síntese e avaliação da atividade de análogos do gibilimbol B e de seu isômero constitucional, gibilimbol A, mostrando que há um incremento na atividade. Os resultados obtidos, discutidos na seção 2.2 deste trabalho, foram muito promissores quanto à atividade antiparasitária, mas a citotoxicidade para células mamíferas foi relativamente alta. Dessa forma, esse trabalho tem como objetivo principal explorar novas modificações moleculares na estrutura desses análogos de forma a avaliar o impacto das modificações na atividade nas principais formas evolutivas do parasita encontradas no organismo humano, tripomastigota e amastigota, e ao mesmo tempo reduzir sua citotoxicidade para células mamíferas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Doença de Chagas

Descrita pelo médico brasileiro Carlos Chagas no início do século XX, a doença que leva seu sobrenome, foi a primeira parasitose a ter o seu agente causador e vetor descritos pelo mesmo cientista (PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2015). O agente causador dessa infecção é o *Trypanosoma cruzi*, que classicamente invade o organismo humano através do contato com as fezes do vetor invertebrado *Triatoma infestans* depositadas próximo ao local de sua picada. Entretanto, novas formas de transmissão estão ajudando a disseminar a doença para países não endêmicos, devido aos fenômenos migratórios humanos, à transfusão sanguínea e ao transplante de órgãos infectados (WHO, 2015).

Historicamente, a DC era estritamente rural; porém com o êxodo, o aumento da imigração e mudanças de âmbito socioeconômico, o perfil epidemiológico da doença vem mudando, com casos reportados em países da Europa, Ásia e Oceania. A maior parte dos casos ainda se distribui na região das Américas (figura 1), ocorrendo desde o sul do Canadá, Estados Unidos e predominando na América Latina, com uma estimativa de prevalência de 8 milhões de pessoas infectadas no total. Isso coloca a DC entre os principais problemas de saúde pública em âmbito mundial (WHO, 2015).

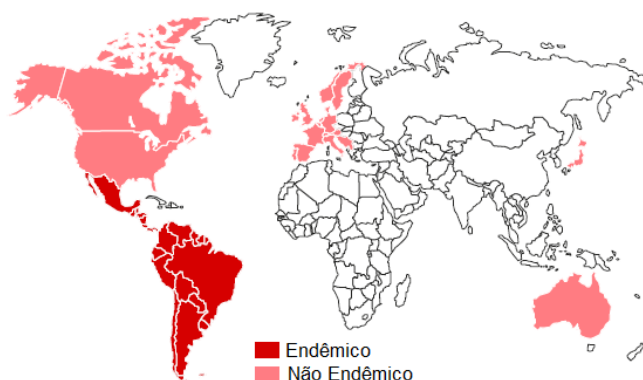


Figura 1: Distribuição geográfica da Doença de Chagas (adaptado de DNDi, 2017).

Desde a década de 90, a Organização Mundial da Saúde (WHO) realiza esforços para controlar a transmissão através de campanhas de combate ao vetor. Porém, como mencionado anteriormente, existem diferentes formas de transmissão que continuam a propagá-la. Devido ao grande período de latência da doença, muitas pessoas são portadoras do parasita sem tomar conhecimento, e por falta de controle acabam transmitindo o protozoário por transfusões de sangue ou transplantes de órgãos, principalmente em países não endêmicos, onde não está estabelecida a realização de testes parasitológicos antes desses procedimentos (SCHMUNIS, 2007; SERAFIM, 2011, WHO, 2012; COURA, 2015b; PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2015). A transmissão congênita ou vertical, acidentes laboratoriais, co-infecção com HIV, tratamentos com fármacos imunossupressores e neoplasias também são problemas a serem considerados e que dificultam o tratamento (NEVES, 2004; PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2015; WHO, 2015).

Outro dilema que vem ganhando proporção é a transmissão por via oral do parasita devido à ingestão de alimentos contaminados por excrementos do triatomíneo ou sua trituração juntamente com cana-de-açúcar ou açaí, bastante consumidos no Brasil. Nesse caso, o trabalho de controle do vetor nas moradias e com o uso de inseticidas em zonas povoadas não controla o problema, uma vez que o inseto se encontraria livre na natureza (COURA, 2015a).

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (figura 2) depende de dois hospedeiros: o intermediário invertebrado, sendo mais comum o triatomíneo *Triatoma infestans*, e o hospedeiro definitivo vertebrado. A forma parasitária que se desenvolve no inseto vetor é a epimastigota, capaz de se multiplicar no intestino do inseto. Ao final do intestino o parasita evolui para a forma tripomastigota metacíclica, forma infectante para hospedeiro definitivo. Ao se alimentar do sangue do hospedeiro vertebrado, o vetor

defeca no local e os parasitas presentes nas fezes são transferidos para a corrente sanguínea, uma vez que a picada coça e a fricção os arrasta para o local da lesão causada pela picada (ocasionalmente há a formação de um inchaço ou “chagoma” na região). A forma tripomastigota metacíclica entra em contato com as células locais, principalmente os macrófagos abundantes no tecido epitelial. Dentro das células, a forma predominante é a amastigota, capaz de se multiplicar e eventualmente formar a forma tripomastigota novamente. Essa capacidade de divisão binária torna a forma amastigota responsável pela fase crônica da doença, na qual a taxa parasitária na corrente sanguínea é quase ou totalmente nula. Após a replicação, eventualmente ocorre lise celular devido ao grande número de novos parasitas formados, liberando uma nova carga parasitária no organismo, que pode ficar no sangue ou linfa ou migrar para outros tecidos infectando novas células. Apesar de poder infectar qualquer tipo de célula, existe uma seletividade do parasita por células cardíacas, do sistema nervoso central e musculatura esquelética, sendo possível notar o aparecimento de alguns sinais e sintomas característicos, como a cardiomegalia. Esses novos protozoários flagelados são capazes de infectar outras células em diferentes tecidos, estágio onde é possível notar o aparecimento de alguns sinais e sintomas da doença (NEVES, 2004; NAGAJYOTHI *et al.*, 2012; PEREIRA, NAVARRO, 2013; BERMUDEZ *et al.*, 2016).

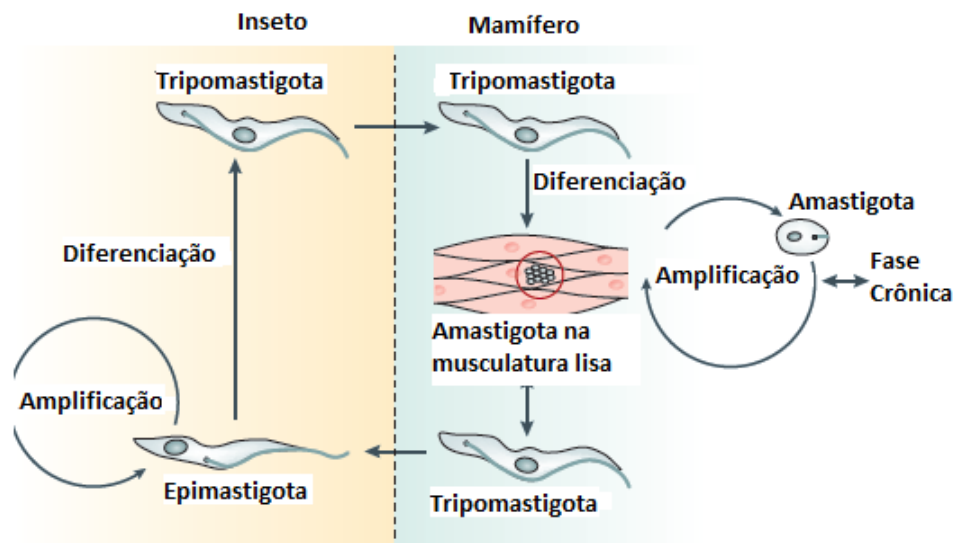


Figura 2:Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (adaptado de Field *et al.*, 2017).

A doença se manifesta em três fases: aguda, latente e crônica. A fase aguda pode ou não ser sintomática e é a mais comum na primeira infância causando o óbito de 2 a 8% das crianças infectadas (RIBEIRO *et al.*, 2009). Nesse estágio, os sintomas mais comuns são mal-estar, febre, vômitos e diarreia, aparecendo 8 a 10 dias após a infecção e que persiste por até 10 semanas. Pode ser fatal se houver insuficiência cardíaca aguda. No entanto, pode também se apresentar como apenas um mal-estar febril que se resolve espontaneamente antes que seja diagnosticada ou tratada (BERMUDEZ *et al.*, 2016).

O diagnóstico é feito por microscopia do sangue e xenodiagnóstico, mas a doença inicial causa apenas sintomas leves e inespecíficos, muitas vezes negligenciados. Outras formas de diagnóstico incluem reação em cadeia da polimerase (PCR), mais sensível que culturas sanguíneas ou xenodiagnóstico, e no caso de infecção neonatal, a detecção é possível após os 8 meses através de exames sorológicos (RIBEIRO *et al.*, 2009; SERAFIM, 2011; PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2015).

A fase latente se estabelece caso não haja a eliminação do parasita do organismo e pode persistir assintomática por décadas. O paciente é considerado latente através de resultados positivos para IgG específicas ou demonstração da presença do parasita no

organismo, mesmo com eletrocardiograma normal e sem anormalidades no tamanho do coração, esôfago e cólon observadas em raio-X, além da ausência de sinais e sintomas. Nesse período o parasita percorre o organismo através da corrente sanguínea e linfática (NEVES *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2006; REITHINGER *et al.*, 2007).

A fase crônica da doença é caracterizada pela presença predominante da forma amastigota do parasita, no ambiente intracelular. Após anos de latência, começam a aparecer os principais sinais clínicos dessa patologia, sendo as manifestações cardíacas (associadas à cardiomegalia) as mais preocupantes (insuficiência cardíaca, aneurisma, arritmia). Essas manifestações se desenvolvem em cerca de 20 a 40% dos pacientes e ocorrem devido à resposta do organismo à inflamação visceral causada pela presença do parasita e pela deservação parassimpática. Outros órgãos também podem ser afetados, como o intestino e o esôfago, levando a manifestações que incluem deservação entérica e esofágica, que comprometem a motilidade ordenada do cólon e esôfago (MARTINS-MELO *et al.*, 2012; BERN, 2015; BERMUDEZ *et al.*, 2016).

O objetivo da farmacoterapia é, então, suprimir a infecção ou impedir o desenvolvimento do parasita do organismo, eliminando-o do sistema vascular e linfático, bem como dos tecidos onde se multiplica. Desde a década de 70 quando o benznidazol e o nifurtimox foram introduzidos no mercado não houve mais nenhum candidato à antichagásico que fosse aprovado pelas agências reguladoras (PEREIRA, NAVARRO, 2013; CHATELAIN, 2015).

Os dois fármacos disponíveis são moléculas nitroaromáticas capazes de formar radicais livres ou espécies eletrofílicas reativas, e assim estão associadas a significativos efeitos adversos, sendo os mais relatados a perda de peso, sintomas gastrointestinais diversos e alergias, que aumentam progressivamente com a dose e o período prolongado da terapia (PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2015).

Ambos os fármacos são compostos que contém o grupo nitro ligado a um anel heteroaromático, furano ou imidazólico, e que no organismo, mamífero ou parasita, sofrem ação de nitroredutases que reduzem o grupo nitro em uma amina primária. Esse processo gera alguns intermediários como radicais livres e metabólitos eletrofílicos que são capazes de se ligar de forma covalente a macromoléculas e ao DNA. Os mamíferos contam com uma série de mecanismos intrínsecos, enzimáticos ou não, para se proteger da ação de radicais livres. Algumas enzimas envolvidas nesse processo estão apresentadas na figura 5, como a superóxido dismutase e o sistema glutaciona/glutaciona redutase. Já o parasita apresenta certa dificuldade em lidar com esses radicais exógenos, contando principalmente com a ação do sistema tripanotiona/tripantotiona redutase, que neutralizam os intermediários eletrofílicos gerados no metabolismo desses fármacos (MAYA *et al.*, 2007).

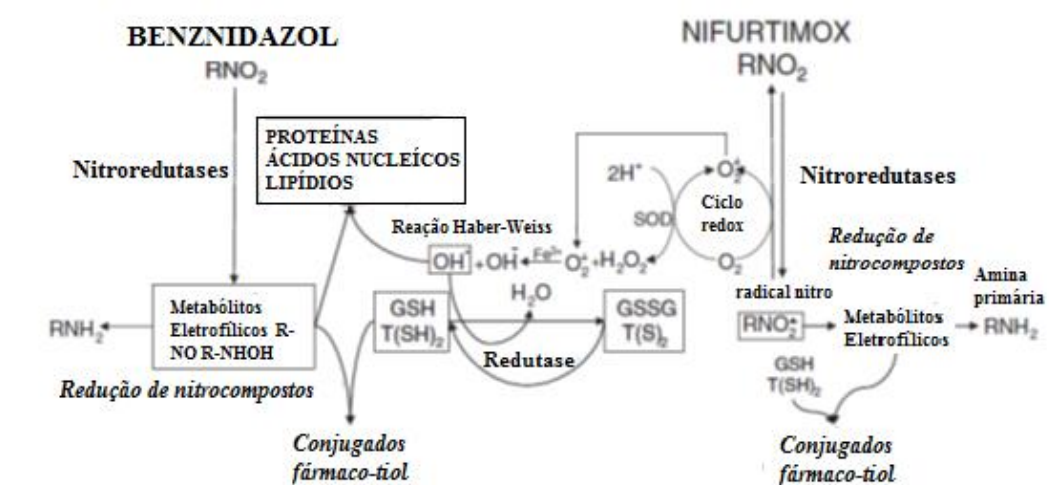


Figura 5: Metabolismo do benznidazol e nifurtimox (MAYA *et al.*, 2007).

O benznidazol (figura 3) é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da DC por apresentar melhor perfil de segurança e eficácia com relação ao nifurtimox. É, também, o único disponível comercialmente no Brasil. Sua maior eficácia é observada na fase aguda da doença que, como discutido anteriormente, muitas vezes não é diagnosticada a tempo de se realizar o tratamento. Sua ação se deve a formação de ligações covalentes com macromoléculas importantes para o metabolismo do

parasita, como cisteína-redutases e o próprio material genético, além do efeito da redução enzimática do grupo nitro gerando um radical. (PEREIRA, NAVARRO, 2013; TROCHINE *et al.*, 2014; BERMUDEZ *et al.*, 2016).

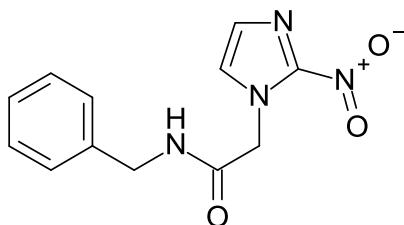


Figura 3: Estrutura química do benznidazol.

A recomendação para o tratamento da DC é que seja feito por via oral por 60 dias, em doses de 5 a 7 mg/kg no caso de pacientes adultos e 10mg/kg para crianças. A eficácia do tratamento com o benznidazol também depende da aderência do paciente, apesar dos efeitos adversos que acabam por aparecer devido ao longo período de terapia e altas dosagens, como dermatite (devido à hipersensibilidade), polineurite, depressão da medula óssea e linfoma (PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2015; BERMUDEZ *et al.*, 2016).

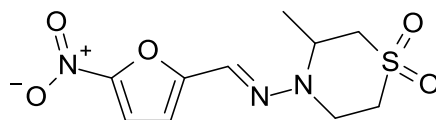


Figura 4: Estrutura química do nifurtimox.

A ação do nifurtimox (figura 4) também depende da sua entrada no ciclo redox após a redução intracelular do grupo nitro, atuando de forma semelhante ao benznidazol. O tratamento com nifurtimox é ainda mais longo, necessitando de 60 a 90 dias, com doses diárias recomendadas pela WHO de 8 a 10 mg/kg para pacientes adultos (divididos em 3 doses diárias) e de 15 a 20 mg/kg para crianças (divididos em quatro doses diárias). Esse fármaco causa maior incidência de efeitos adversos, como náusea, vômito, diarreia, além de uma parte significativa dos pacientes apresentarem sintomas neurológicos que variam desde confusão até psicoses. Já foi também

observada ocorrência de maior estresse oxidativo em animais, especificamente no pâncreas e coração. Sendo assim, o tratamento de pacientes crônicos com o nirfutimox pode representar uma ameaça à saúde. Além disso, este fármaco não está disponível para os pacientes em alguns dos países endêmicos, incluindo o Brasil (MAYA *et al.*, 2007; COURA, DIAS, 2009; BERMUDEZ *et al.*, 2016).

Um alvo relativamente novo identificado como tendo relação com a atividade tripanocida é a cruzipaína, uma cisteíno-protease, cuja expressão gênica varia com a forma do parasita e é encontrada em lipossomas no tripomastigota e na membrana celular nas amastigotas, principalmente (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2017). A atividade da cruzipaína está relacionada com a capacidade de infecção e evasão do sistema imunológico do hospedeiro, bem como com a replicação do amastigota (WATANABE COSTA *et al.*, 2016). Outros estudos demonstram, com o uso de inibidores da cruzipaína, que ela interfere na transformação da forma tripomastigota em amastigota e vice-versa, alterando o ciclo de vida do parasita (BRANQUINHA *et al.*, 2015).

Outra enzima de interesse como alvo é a tripanotiona-redutase, que regula o equilíbrio redox dentro da célula parasitária, reduzindo a quantidade de espécies reativas de oxigênio e radicais livres no citosol, de forma semelhante ao sistema mamífero que faz isso usando diferentes substratos e enzimas, como a glutatona e glutatona redutase, respectivamente. (RIVAROLA, PAGLINI-OLIVA, 2002; BERMUDEZ *et al.*, 2016; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2017). A infecção da célula hospedeira gera radicais livres com o intuito de eliminar o parasita do organismo e tanto a tripanotiona quanto a tripanotiona redutase são essenciais nesse processo de proteção da célula parasitária (ILARI *et al.*, 2017).

Conhecendo a atual situação da DC em âmbito mundial, é nítida a necessidade de se buscar novas moléculas que apresentem melhores resultados quando comparadas com os fármacos disponíveis no mercado. De forma geral, uma molécula é considerada *hit* se apresentar CE_{50} menor que $10\mu M$ contra a forma intracelular e é um *lead* se apresentar grande seletividade para as células parasitárias do que pelas mamíferas (com índice de seletividade maior que 100) (KATSUNO *et al.*, 2015).

Uma vertente que vem sendo explorada são os derivados sintéticos com núcleos que se mostraram promissores inibidores enzimáticos para o parasita. Dentre esses pode-se citar aqueles que apresentam o anel tiazólico, (GOMES *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017), tiosemicarbazonas (BLAU *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2014; ESPÍNDOLA *et al.*, 2015; FONSECA *et al.*, 2016; VITAL *et al.*, 2017), tiazolidinonas (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2015) e hidrazonas (WATANABE COSTA *et al.*, 2016;), entre outros.

No Brasil vários grupos de pesquisa vêm se empenhando em buscar novas moléculas que apresentem atividade anti-tripanosoma. Muitos desses grupos vêm buscando na natureza e nos conhecimentos etnofarmacológicos plantas que apresentem atividade antiparasitária com o objetivo de isolar produtos naturais que sejam responsáveis por essa atividade (OLIVEIRA *et al.*, 2012; REA *et al.*, 2013; ADADE *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2015; MACIEL *et al.*, 2016; SANDJO *et al.*, 2016; GRECCO *et al.*, 2017).

2.2. Produtos Naturais como Protótipos

Desde os tempos antigos, a busca pelo tratamento de enfermidades era a natureza, identificando-os em plantas ou animais. A grande variedade de estruturas químicas que são encontradas nessas fontes é superior àquela encontrada em bibliotecas de compostos sintéticos (TEMPONE *et al.*, 2007; KING *et al.*, 2011; SHARMA, 2015). A etnofarmacologia é a área dentro das ciências farmacêuticas que estuda o conhecimento popular sobre “medicamentos naturais”, sendo as plantas medicinais verdadeiras farmácias naturais que contribuíram significativamente no entendimento da farmacologia atual, por fornecer moléculas usadas como ferramentas farmacológicas ou até mesmo como princípios ativos propriamente ditos (ELISABETSKY, 2003; VIEGAS JR, BOLZANI, BARREIRO, 2006).

Os produtos naturais vêm servindo desde sempre como inspiração para a descoberta e desenvolvimento de fármacos, uma vez que comumente apresentam boa atividade e seletividade para o seu alvo, seja ele um patógeno ou algum ligante endógeno. Um problema encontrado comumente é a toxicidade desses compostos para as células mamíferas, o que não é de surpreender, já que na maioria dos casos essas moléculas são produzidas pelo metabolismo secundário das plantas, responsável justamente pela proteção da mesma. De fato, muitas moléculas naturais são identificadas como potenciais agentes citotóxicos (BALBINO, DIAS, 2010). Dessa forma, fica a cargo dos químicos-farmacêuticos estudarem essas estruturas e proporem modificações que viabilizem sua síntese, deixando-a mais simples e barata, mas mantendo o farmacóforo. Ainda, pode-se otimizar seu efeito, reduzir a toxicidade e favorecer a absorção e distribuição do composto no organismo (TEMPONE *et al.*, 2007; FLORES *et al.*, 2009).

De fato, ao buscar a literatura por produtos naturais que apresentem atividade antiparasitária, há uma enorme quantidade de trabalhos que mostram, muitas vezes, o isolamento de alguma substância, nova ou já conhecida, e que teve atividade comprovada. Em menor número, são encontrados trabalhos onde há, além do isolamento de algum produto natural, também algum tipo de modificação molecular na estrutura, seja por estratégias semi-sintéticas ou totalmente sintética, para se obter outros análogos aprimorados.

Com as melhorias tecnológicas, que permitiram facilidades na preparação de extratos e o isolamento e caracterização de produtos naturais desconhecidos, e com a incessável busca da indústria farmacêutica por novas entidades químicas, nota-se que a pesquisa em produtos naturais tem sido foco de muita atenção. Produtos naturais têm se mostrado promissores no sentido de servir como inspiração para a pesquisa de novos fármacos em diversas áreas. Entretanto, neste trabalho, são destacados alguns artigos que mostram quão eficazes podem ser os produtos naturais em relação à atividade anti-*T. cruzi*. Esses relatos foram encontrados em uma busca pela base de dados PubMed, sem restrição de tempo, utilizando os termos “natural product” e “*Trypanosoma cruzi*” como palavras-chave.

A classe dos terpenos tem importância devido a sua abundância na natureza e grande variabilidade estrutural, bem como a função protetora que alguns desses compostos podem ter contra herbívoros e fitopatógenos. Ramírez-Macías *et al.* (2012) descrevem 4 derivados terpenóides, dentre os quais dois (figura 6) mostraram-se bastante ativos contra formas extra e intracelulares do *T. cruzi* (epimastigotas e amastigotas, respectivamente), com valores de CE₅₀ para a forma amastigota igual a 6,0 e 6,8 μ M, **I** e **II**, respectivamente. Os índices de seletividade para a ação

antiparasitária também foram bastante interessantes, sendo 16 para **I** e 23 para **II**, comparando a atividade sob a forma amastigota e citotoxicidade em células Vero.

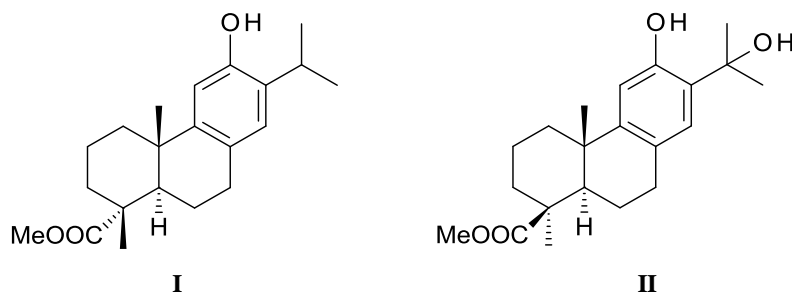


Figura 6: Derivados terpenóides ativos contra *T. cruzi*.

Como representantes da classe dos alcalóides, pode-se citar o trabalho de Bringmann *et al.* (2011), onde são elucidadas as estruturas fenólicas e não fenólicas de compostos isolados de *Ancistrocladus cochinchinensis*, que apresentam em sua estrutura o núcleo naftilisoquinolina. Dos compostos testados, o que apresentou a melhor atividade foi **III** (figura 7) com CE_{50} 0,03 μ M e CC_{50} 54-79 μ M.

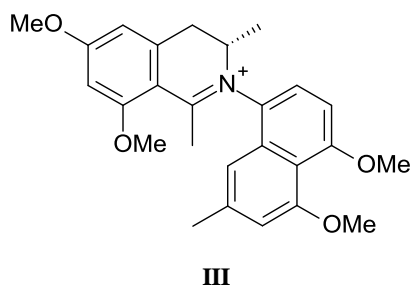


Figura 7: Estrutura de um alcalóide ativo contra *T. cruzi*.

Uma série de cromenos isolados de espécies do gênero *Piper* já foram estudados quanto a potencial atividade biológica. No trabalho de Batista Jr. *et al.* (2011), foi feita a avaliação anti-tripanosoma de algumas dessas moléculas, bem como de derivados sintéticos. Um dos cromenos isolados de *P. gaudichaudianum* seu derivado semi-sintético metilado (respectivamente **IV** e **V** na figura 8), foram bastante ativos contra a forma epimastigota do *T. cruzi* (CE_{50} 34 e 2,8 μ M, respectivamente).

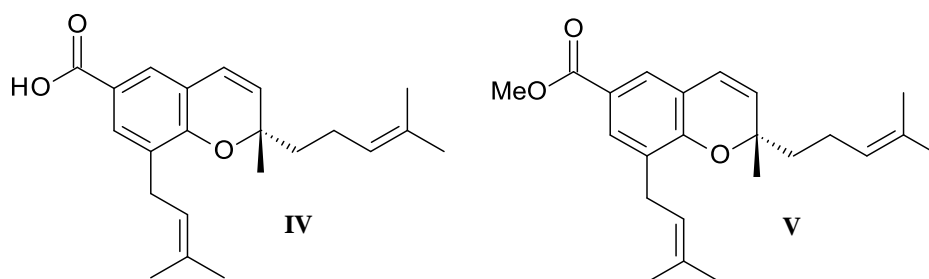


Figura 8: Derivado cromenos ativos contra *T. cruzi*.

Considerando especificamente compostos oriundos de plantas do gênero *Piper*, uma série de trabalhos mostra que diversas espécies estão associadas à atividade tripanocida de metabólitos secundários como amidas, ácidos benzóicos e derivados, cromenos entre outros (FLORES *et al.*, 2009; LAGO *et al.*, 2009; BATISTA Jr *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012; VEIGA-SANTOS *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2016).

Um trabalho publicado em 2012 por Oliveira *et al.* serviu de inspiração para o presente trabalho. Nele, foi relatada a potencial atividade biológica contra a forma tripomastigota do gibilimbol B, um alquilfenol isolado do extrato metanólico das folhas de *Piper malacophyllum*. O valor de CE_{50} encontrado para *T. cruzi* foi de 75 μ M, enquanto a citotoxicidade para células de mamífero foi de 254 μ M (índice de seletividade 3,4). Após o isolamento e avaliação de um novo análogo natural, o gibilimbol A, cuja atividade se mostrou inferior ao gibilimbol B, foi possível inferir que a funcionalização mais próxima ao anel aromático poderia ser favorável à atividade.

Assim, foram planejados inicialmente 8 análogos do gibilimbol B (figura 9) propondo modificações moleculares como a inclusão de grupos funcionais na cadeia lateral do anel fenólico. O objetivo dessa modificação era aumentar o *drug likeness* dessas moléculas em relação ao protótipo, adicionando grupos funcionais que não somente pudessem acrescentar na estrutura novos pontos de interação com o alvo ainda desconhecido (assim melhorando a sua atividade biológica e, possivelmente, sua

seletividade), mas também aumentando a solubilidade em água e inserindo pontos de labilidade metabólica para reduzir a toxicidade *in vivo*.

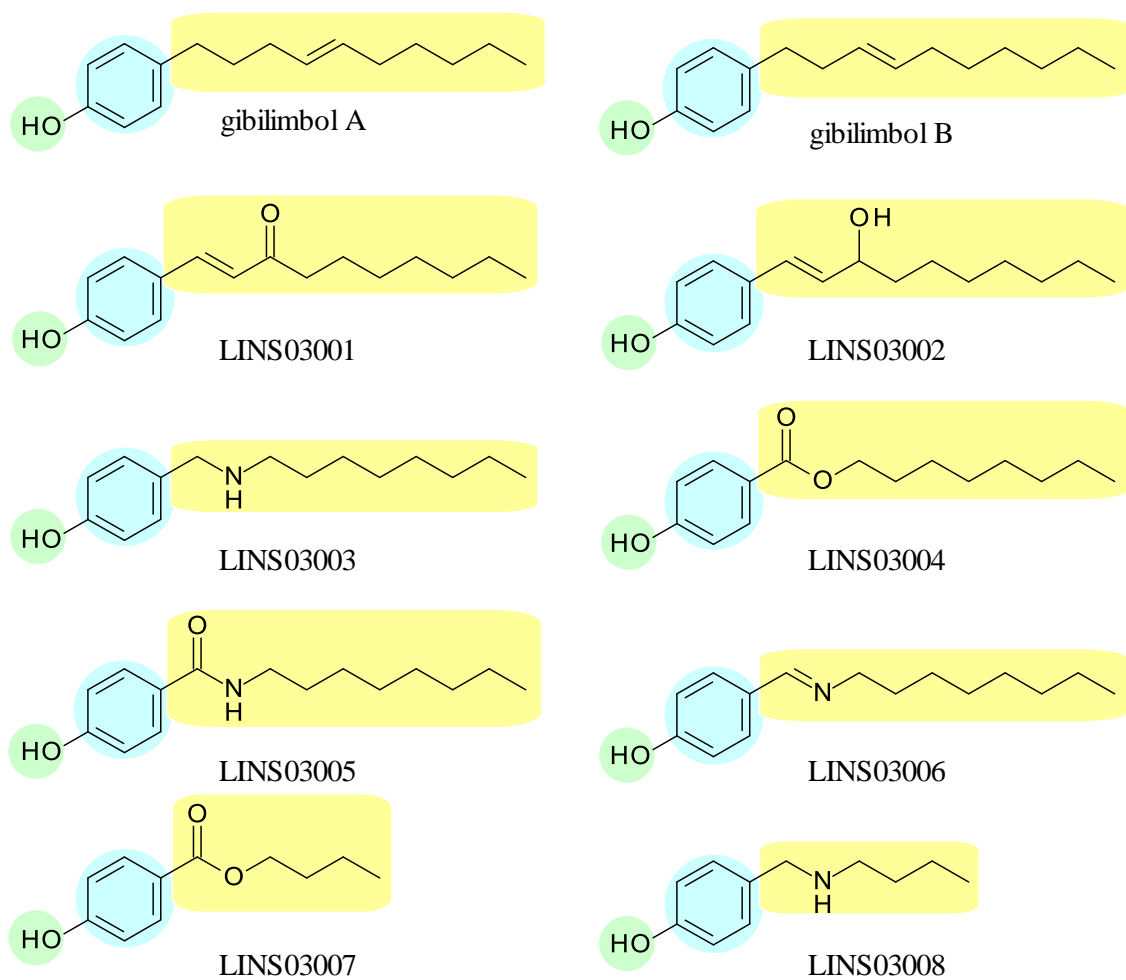


Figura 9: Estruturas dos derivados alquilfenólicos do gibilimbol B

Tabela 1: Atividades anti-tripanosoma dos produtos naturais e derivados sintéticos contra as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* e citotoxicidade em células mamíferas.

Compostos	CE ₅₀ μM ^a (95% IC)		CC ₅₀ μM ^b (95% IC)	IS ^c	
	<i>T. cruzi</i> tripomastigotas	<i>T. cruzi</i> amastigotas	Células NCTC	TCT	TCA
LINS 03001	11.8 (10.1-13.1)	22.5 (19.1-26.5)	82.8 (66.5-103.1)	7.0	3.7
LINS 03002	6.1 (5.5-6.7)	NA	49.5 (32.9-74.4)	8.1	-
LINS 03003	17.0 (14.0-20.8)	5.5 (4.6-6.5)	23.5 (15.5-82.9)	1.4	4.3
LINS 03004	4.5 (3.7-5.4)	ND	130.3 (107.9-157.4)	29.0	-
LINS 03005	26.5 (22.6-31.2)	NA	45.4 (27.3-75.3)	1.7	-
LINS 03006	NA	NA	99.2 (79.3-124.3)	-	-
LINS 03007	NA	26.4 (20.4-33.3)	167.8 (98.3-286.4)	-	6.4
LINS 03008	NA	NA	>300	-	-
gibilimbol A^d	102.5 (74.5-122.7)	NA	224.6 (201.3-256.9)	2.2	-
gibilimbol B^d	75.3 (62.3-90.9)	NA	254.1 (217.9-296.3)	3.4	-
benznidazol^d	440.7 (406.1-478.3)	230.3 (176.2-301.1)	269.9	0.6	1.2

^aCE₅₀: concentração efetiva para 50%; ^bCC₅₀: concentração citotóxica para 50%; ^cIS: Índice de Seletividade calculado entre CC₅₀/CE₅₀ (TCT: *T. cruzi* tripomastigotas; TCA: *T. cruzi* amastigotas).

^ddisponível em Varela *et al.* (2017).

NA: Não ativo. ND: não determinado.

Os resultados desse trabalho (VARELA *et al.*, 2016), mostrados na tabela 1, foram bastante promissores. Dentre os análogos propostos, o composto LINS03003 foi o mais ativo da série, exibindo CE₅₀ 17 μM para a forma tripomastigota e 5,5 μM para a forma amastigota. De fato, todos os compostos foram mais ativos que os protótipos para a forma tripomastigota, e três deles foram ativos contra a forma amastigota, sendo esta última de grande interesse quando se pensa no tratamento de pacientes crônicos. Entretanto, o problema encontrado nessa série é que os compostos mostraram citotoxicidade maior para as células mamíferas do que a observada para os protótipos naturais e o próprio fármaco de referência, que já é conhecidamente tóxico.

Assim, em continuação à nossa linha de planejamento de novas moléculas utilizando produtos naturais como protótipos, realizou-se uma busca na literatura por

similaridade molecular com os gibilimbóis que apresentaram bom perfil de atividade anti-*T.cruzi* baixa citotoxicidade, para verificar possíveis fatores que auxiliariam no desenho de novos derivados. Essa abordagem que consiste em juntar fragmentos de compostos biologicamente ativos de forma a obter novos derivados que possam carregar características das moléculas originais é conhecida como *scaffold hopping* (BÖHM *et al.*, 2004). Assim, as moléculas abaixo apresentadas foram selecionadas, e têm algumas características destacadas em semelhança aos análogos anteriormente avaliados por nosso grupo, que justificam o planejamento de novas estruturas com modificações em posições estratégicas para gerar, em teoria, análogos menos citotóxicos e com atividade igual ou superior aos anteriores.

O primeiro composto a ser utilizado como justificativa para as modificações propostas foi também isolado de *Piper malacophyllum* (VARELA *et al.*, 2017) e tem estrutura bastante similar à dos gibilimbóis A e B (figura 9). Entretanto, essa molécula (VI) apresenta apenas 8 carbonos na cadeia lateral (ao invés de 10), além de um anel benzodioxólico ao invés de uma fenol (figura 10). Sua atividade nas formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi* foi avaliada, resultando em valores de CE₅₀ de 67 µM e 32µM, respectivamente. Além disso, não foi detectada citotoxicidade apreciável até a concentração de 200µM, gerando assim índices de seletividade superiores a 3 e 6 para cada forma, respectivamente.

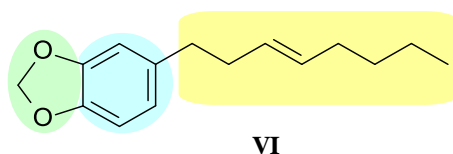


Figura 10: Composto isolado de *Piper malacophyllum*, 5-[(*E*)-oct-3-enil]-1,3-benzodioxol.

Veiga-Santos *et al.*(2013) relataram dois compostos, piperovatina e piperolonguminina (VII e VIII, respectivamente - figura 11), que foram isolados de *Piper ovatum* foram testados contra as formas epimastigota e amastigota do parasita.

Os valores de CE_{50} para a forma epimastigota foram $41\mu\text{M}$ e $54\mu\text{M}$ e para a forma amastigota foram $35\mu\text{M}$ e $34\mu\text{M}$, respectivamente. No caso das formas amastigotas, os compostos demonstraram índice de seletividade para o parasita de 9,5 para a piperovatina e 8,9 para a piperolonguminina.

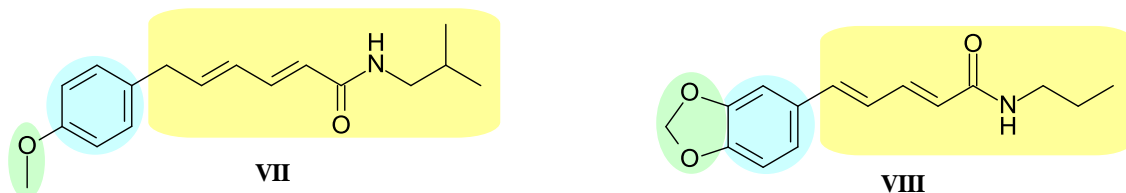


Figura 11: piperovatina (VII) e piperolonguminina (VIII).

O trabalho publicado por Lima *et al.* (2016) reportou o estudo fitoquímico de *Calea uniflora*, levando ao isolamento de 9 compostos fenólicos. Dentre eles, o cafeato de etila (IX) (figura 12) apresentou atividade contra a forma amastigota do parasita com CE_{50} de $18\mu\text{M}$. Além disso, a citotoxicidade desse composto foi baixa, exibindo valor de CC_{50} de $236\mu\text{M}$, gerando índice de seletividade de aproximadamente 13 para o parasita. O ácido cafeíco também estava presente entre os compostos isolados nesse trabalho, entretanto não apresentou atividade apreciável contra a forma amastigota. Entretanto, um trabalho de Grecco *et al.* (2012) mostrou CE_{50} de $55\mu\text{g/mL}$ para esse composto contra a forma tripomastigota de *T. cruzi*, mas com CC_{50} de $34\mu\text{g/mL}$ para células mamíferas. Esses resultados sugerem que a esterificação dessa molécula pode levar ao aumento de atividade contra a forma proliferativa do parasita, mas também reduzir a toxicidade do composto para as células do hospedeiro.

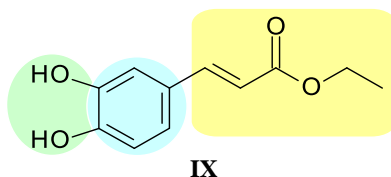
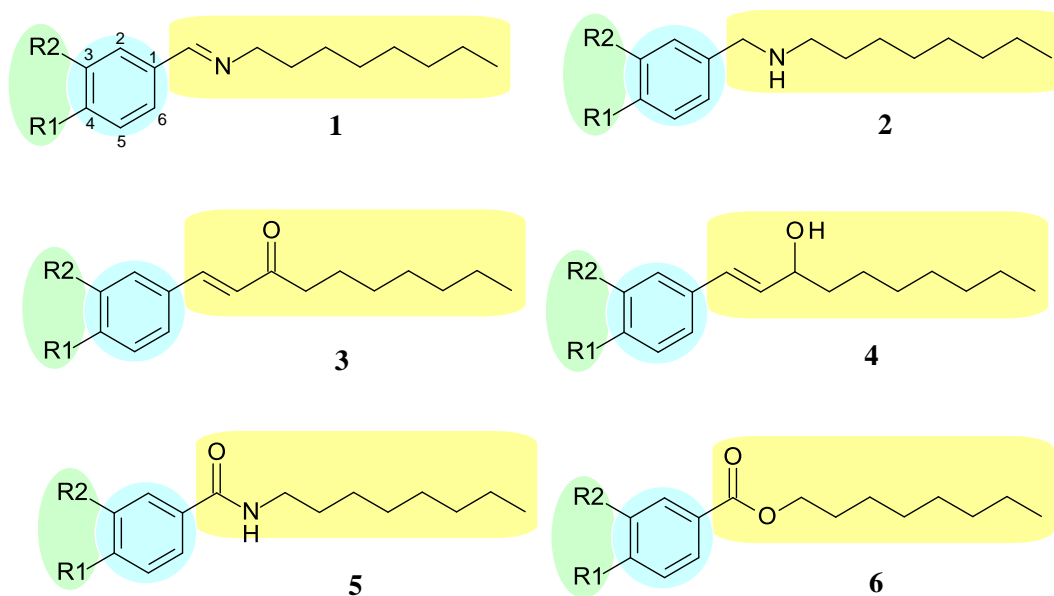


Figura 12: Cafeato de etila (IX).

3. OBJETIVOS

Mantendo então os grupos funcionais que potencializaram a atividade dos compostos com relação aos gibilimbóis, os compostos propostos apresentam modificações no anel aromático para estudar a importância da hidroxila fenólica para a atividade e citotoxicidade dos compostos. Como destacado nas figuras 7-10, as cores representam as características em comum desses compostos, assim como nos derivados propostos (figura 13). Neles temos uma cadeia lateral lipofílica e um anel aromático, comum a todos, sendo que as modificações propostas são os substituintes nas posições 3 e 4 do anel aromático.



- a: R1= OMe R2= H
b: R1= H R2= H
c: R1= OH R2= OH
d: R1= OH R2= OMe
e: R1= OMe R2= OMe

Figura 13: Análogos propostos no projeto, planejados usando os gibilimbóis e demais produtos naturais como protótipos estruturais.

Sendo assim, o objetivo principal desse trabalho é sintetizar esses compostos e avaliar sua atividade contra *T. cruzi* e sua toxicidade seletiva para os parasitas em ensaios biológicos já estabelecidos anteriormente. Os objetivos específicos são:

- Sintetizar os compostos planejados com rendimentos adequados;
- Caracterizar os compostos obtidos através de técnicas espectroscópicas adequadas como ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 e espectrometria de massas de alta e baixa resolução;
- Avaliar a pureza dos compostos obtidos por técnicas cromatográficas, especificamente cromatografia gasosa;
- Avaliar a atividade antiparasitária em formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos em células de mamíferos para obtenção do índice de seletividade;
- Avaliar a capacidade dos análogos mais promissores em causar alteração na permeabilidade da membrana celular;
- Verificar a contribuição dos grupos adicionados para a atividade antiparasitária através do cálculo de eficiência de grupo (*group efficiency*);
- Calcular descritores físico-químicos, topológicos e estruturais a fim de estudar a relação estrutura-atividade entre os compostos testados por meio análise exploratória de dados (análise de componentes principais e análise hierárquica de agrupamentos).

4. METODOLOGIA

Os procedimentos sintéticos foram realizados utilizando reagentes e solventes com grau de pureza adequado ao procedimento, obtidos primariamente da Merck, Sigma-Aldrich e Labsynth e utilizados sem purificação adicional. Os equipamentos e vidrarias utilizados são comuns da rotina laboratorial de síntese orgânica.

As reações assistida por micro-ondas foram realizadas em um reator da CEM modelo Discovery, com acessório de alta pressão, em frascos reacionais de 10 mL com septo de teflon e agitação magnética. As condições ajustadas no equipamento são: potência máxima 300 W e pressão máxima 300 psi. As reações realizadas com agitação ultrassônica foram conduzidas em lavadora ultrassônica Ultronique modelo Ecotronics Q1.8, com capacidade de 1,8 L, aquecimento a 50 ± 10 °C e frequência ultrassônica de 40 kHz.

A caracterização dos compostos obtidos foi realizada por avaliação do ponto de fusão (para os produtos sólidos), e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN) e de carbono-13 (^{13}C -RMN), operando a 300 MHz e 75 MHz, respectivamente. Os deslocamentos químicos (δ , em ppm) foram medidos através do padrão interno tetrametilsilano (TMS), usando como solvente o clorofórmio deuterado (CDCl_3), em um espectrômetro Bruker Advance 300. Quando aplicável, as constantes de acoplamento (J) foram calculadas e são apresentadas em Hz.

A pureza dos produtos finais a serem testados quanto à atividade antiparasitária foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas (GC-EMBR) da Shimadzu modelo QP2010 Plus, usando hélio como gás de arraste (fluxo de 1,12 mL/min) em coluna capilar de sílica gel (marca RESTEK, modelo Rtx-5ms, 30m x 0,25mm x 0,25 μm), com temperatura inicial de 80 °C e taxa de aquecimento de 10 °C até a temperatura do injetor de 250 °C que é mantida por 11 minutos e detector a 200

°C. Foram considerados puros os compostos que apresentassem pureza cromatográfica superior a 95%. O espectro de massas de baixa resolução (EMBR) obtido por ionização por impacto eletrônico (70 eV) foi também utilizado para caracterização dos compostos. O íon-radical e seus fragmentos são apresentados em relação massa/carga (m/z).

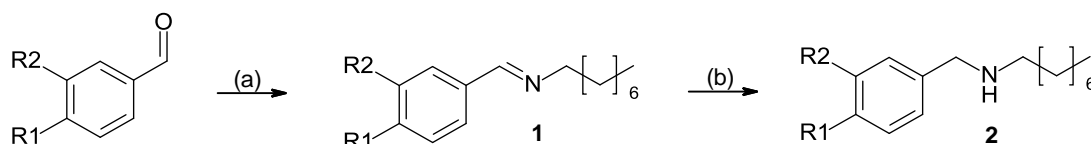
Os ensaios de atividade antiparasitária, citotoxicidade e de alteração da permeabilidade da membrana celular foram realizados no Instituto Adolfo Lutz, sob responsabilidade e colaboração do Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso. Os procedimentos que utilizaram animais de laboratório foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL) e registrado sob número 042016.

Para o cálculo das propriedades moleculares, análise dos dados e estudos estatísticos foi utilizado um computador equipado com processador Intel® Celeron Quad Core N3460, 2,2 GHz e 4GB de memória RAM, operando com sistema operacional Windows 10®. As propriedades moleculares foram calculadas utilizando o servidor online Molinspiration (Molinspiration Property Calculation Service, 2015) e o software Marvin Sketch 16.1.8.0 (ChemAxon Inc.) em suas configurações padrão. Os cálculos de análise exploratória de dados foram realizados utilizando o software PAST 3.17 (HAMMER *et al.*, 2001).

4.1. Rota Sintética

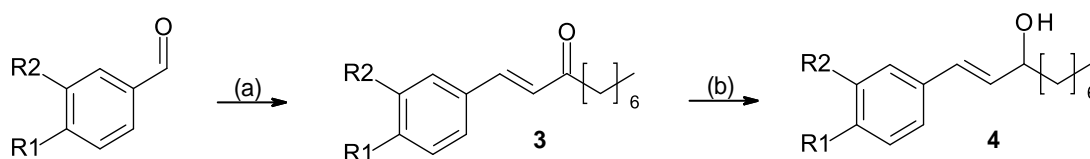
Os compostos planejados foram sintetizados através de reações classicamente conhecidas para a obtenção dos grupos funcionais desejados (éster, amida, imina, amina e carbonila e álcool α,β -insaturados) utilizando procedimentos já estabelecidos por nós em trabalho anterior (VARELA *et al.*, 2016).

Os derivados iminas (**1**) foram sintetizados pela condensação de compostos carbonílicos e aminas, utilizando os aldeídos correspondentes em reação com a 1-octilamina em proporções estequiométricas, em metodologia assistida por ultrassom. Esses compostos serão também utilizados na preparação sequencial das aminas (**2**) através de redução pela reação com boroidreto de sódio (esquema 1).



Esquema 1: Preparação das iminas e aminas. (a) 1-octilamina, 60 °C, 1h; (b) NaBH₄, AcOH, 4h.

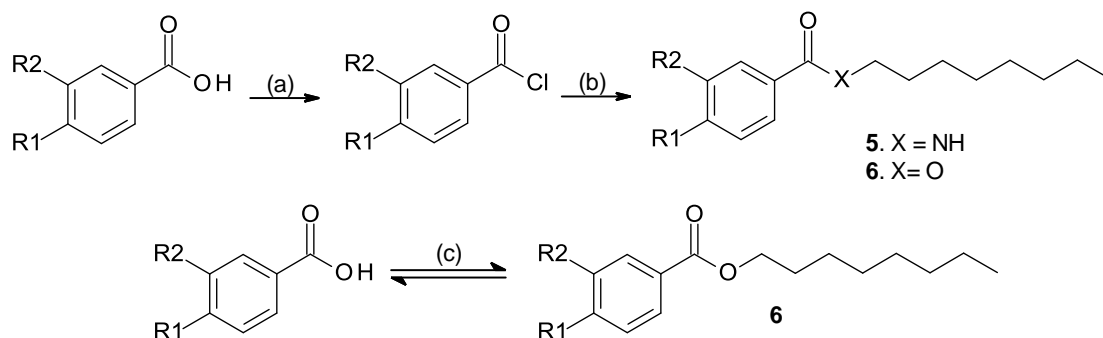
Os compostos carbonílicos α,β -insaturados (**3**) foram sintetizados pela reação clássica de condensação aldólica da 2-nonanona com os aldeídos correspondentes. Partindo-se do anisaldeído, benzaldeído ou 3,4-diidroxibenzaldeído, foram adicionados 1 equivalente da 2-nonanona e 2 equivalentes de hidróxido de sódio, de forma a se obter os compostos correspondentes. Os compostos **3** foram utilizados como reagentes de partida para a obtenção dos compostos reduzidos **4**, através da reação com boroidreto de sódio, obtendo-se assim os derivados hidroxilados correspondentes (esquema 2).



Esquema 2: Preparação dos compostos insaturados. (a) 2-nonanona, NaOH 40%, 12h; (b) NaBH₄, AcOH, 4h.

A síntese das amidas (**5**) e dos ésteres (**6**) seguiu conforme esquema 3, utilizando como reagentes de partida o cloreto de benzoíla, o ácido 4-metoxibenzoico e o ácido 3,4-diidróxibenzoico através de reações de adição-eliminação com o álcool (1-octanol) e amina (1-octilamina) correspondentes. Os ácidos foram inicialmente convertidos ao cloreto de acila correspondente pela reação com cloreto de tionila para a preparação dos

compostos amídicos. Nesse caso, a reação utilizou trietilamina como base para neutralização do HCl formado. A esterificação clássica de Fisher foi utilizada para obter os ésteres, utilizando H_2SO_4 como catalisador.



Esquema 3: Preparação dos ésteres e amidas. (a) SOCl_2 , THF, 2h; (b) 1-octanol ou 1-octilamina, Et_3N , THF, 12h; (c) 1-octanol, H_2SO_4 (cat.), tolueno, 12h.

Todos os produtos foram devidamente purificados por cromatografia em coluna, ou quando possível, por recristalização.

4.2. Síntese dos compostos

4.2.1. Iminas

Os derivados nitrogenados foram sintetizados pela condensação de compostos carbonílicos e aminas com metodologia adaptada de Marchand *et al.* (2009), utilizando o anisaldeído ou benzaldeído e a 1-octilamina em proporções equivalentes.

Em um frasco de fundo chato, 5 mmol de anisaldeído para **1a** (0,6807 g) ou benzaldeído para **1b** (0,5306g) e 5 mmol de n-octilamina (0,6462 g) foram adicionados e submetidos por uma hora no banho de ultrassom à 60°C (figura 14). Ao final da reação o material obtido foi dissolvido em diclorometano, secado Na_2SO_4 anidro e evaporado. O rendimento foi quantitativo para ambos os compostos.

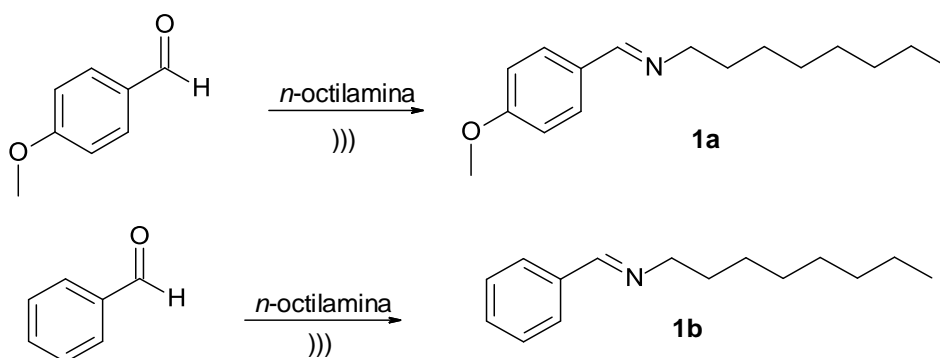


Figura 14: Metodologia adaptada de Marchand *et al.* (2009).

4.2.2. Aminas

Metodologia 1

Os compostos **1** sofreram redução pela reação como boroidreto de sódio (ABDEL-MAGID *et al.*, 1996) levando à formação das aminas **2** correspondentes.

A preparação do triacetóxi boroidreto de sódio (STAB) foi feita através da reação de 3 mmol de boroidreto de sódio (0,1135 g) com 10 mL de ácido acético glacial em um balão com agitação. Ao final da evolução de gases, 1 mmol da imina (0,2175 g) foi adicionado, e a reação prosseguiu sob agitação por 2 horas (figuras 15). O solvente foi evaporado e o resíduo dissolvido em 15 mL de diclorometano e lavado 2x10 mL de solução saturada de NaHCO₃. A fase orgânica foi secada com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi evaporado. O rendimento reacional foi de 96%.

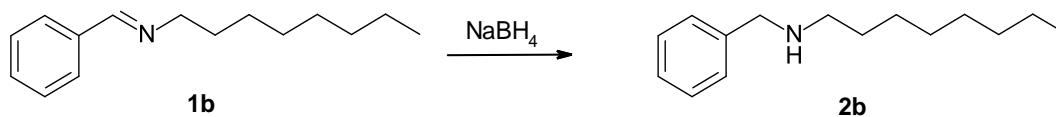


Figura 15: Rota sintética do composto **2b** adaptada de Abdel-Magid (1996).

Metodologia 2

Em um balão de fundo redondo em banho de gelo foram adicionados 1 mmol da imina (0,2474g – **1a**; 0,2173g – **1b**) em 10 mL de metanol. Em seguida foram adicionados lentamente 3 mmol de boroidreto de sódio (0,113 g) sólido e a reação

prosseguiu por 2 horas em temperatura ambiente (figuras 16). O solvente foi evaporado e o resíduo dissolvido em 15 mL de diclorometano e lavado 3x10 mL de solução saturada de NaHCO₃. A fase orgânica foi secada com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi evaporado. Os rendimentos reacionais obtidos estão dispostos na tabela 2.

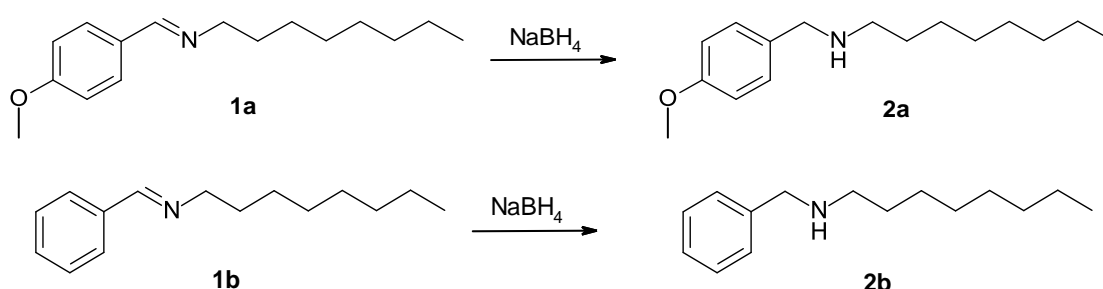


Figura 16: Rota sintética dos compostos **2a** e **2b** adaptada de Abdel-Magid (1996).

Tabela 2: Variações no procedimento de preparação das aminas **2a** e **2b**.

Composto	Rendimento
2a	98%
2b	85%

Metodologia 3

As aminas que possuem dois substituintes no anel aromático foram sintetizadas pela reação de aminação redutiva, sem o isolamento da imina intermediária, seguindo a metodologia descrita por Patterson *et al.* (2015)

Em um balão de 50 mL, 2 mmol do aldeído correspondente (protocatecuíco - **2c**, vanilina - **2d**, veratraldeído - **2e**, figura 17) foram dissolvidos em metanol e em seguida uma solução de 2 mmol 1-octilamina (0,258 g) previamente preparada em metanol foi adicionada no meio reacional. A reação prosseguiu por 3 horas sob refluxo, e a seguir, submetida a resfriamento em banho de gelo, quando 4 mmol de NaBH₄ sólido foram adicionados. A reação prosseguiu *overnight* em temperatura ambiente. O solvente foi evaporado, e à mistura foram adicionados 20 mL de água destilada. A fase aquosa foi

extraída com 3x10 mL de diclorometano, e a fase orgânica foi secada com Na₂SO₄anidro e o solvente foi evaporado. Os produtos **2c** e **2d** foram recristalizados de éter etílico. O composto **2e** foi purificado em cromatografia *flash* com alumina básica, com fase móvel acetato de etila: hexano (2:1). Os rendimentos obtidos estão dispostos na tabela 3.

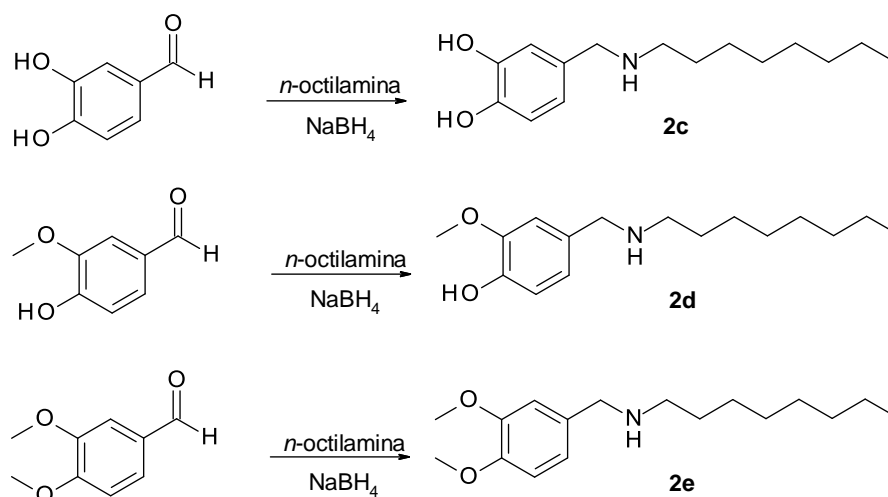


Figura 17: Rota sintética dos compostos **2c**, **2d** e **2e** (Patterson *et al.*, 2015).

Tabela 3: Rendimentos e faixa de fusão das aminas **2c**, **2d** e **2e**.

Composto	Faixa de Fusão	Rendimento
2c	85 – 87 °C	47%
2d	68 – 72 °C	53%
2e	-	43%

4.2.3. Compostos α,β -Insaturados

Metodologia 1

Os compostos carbonílicos foram sintetizados pela reação clássica de condensação aldólica (MASUDA *et al.*, 1996; FUGANTI *et al.*, 1998), utilizando o aldeído correspondente (benzaldeído ou anisaldeído) e 2-nonanona com catálise por hidróxido de sódio e usando etanol como solvente.

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 5mmol de anisaldeído (0,6807 g) para formação de **3a** ou benzaldeído (0,5306g) para **3b** e 5mmol de nonanona (0,7112 g) em 10mL de etanol (figura 18). Em seguida, sob agitação, foram adicionados lentamente 3mL de solução de hidróxido de s 40%, permanecendo sob agitação 24h. Ao final, a solução foi neutralizada com ácido clorídrico 0,1 M, e o etanol foi evaporado, levando à precipitação do produto de interesse, que foi separado por filtração. Os rendimentos são mostrados na tabela 4.

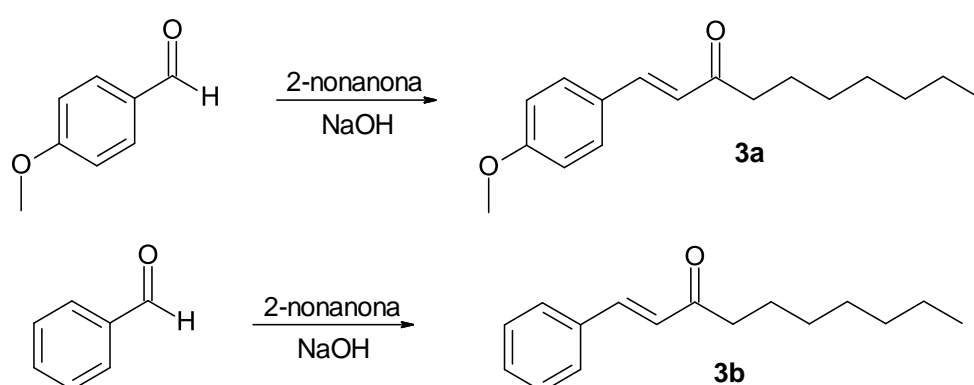


Figura 18: Rota sintética clássica dos compostos **3a** e **3b**.

Tabela 4: Rendimentos para os compostos α,β-insaturados

Composto	Rendimento
3a	43%
3b	59%

Metodologia 2

Seguindo a metodologia adaptada de Piste (2014), 5mmol de anisaldeído (0,6807 g) obtenção de **3a** ou benzaldeído (0,5306g) para **3b** e 5mmol de nonanona (0,7112 g) foram adicionados à um gral de porcelana com 5 mmol de NaOH (0,2 g). A reação prosseguiu por 10 minutos sob trituração, e à mistura obtida foi adicionada água destilada. A mistura foi acidificada com ácido clorídrico 0,1 M. Os produtos foram então recristalizados de etanol/água. Os rendimentos estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5: Rendimentos da metodologia 2 para preparação dos compostos **3a** e **3b** respectivas faixas de fusão.

Composto	Faixa de fusão	Rendimento
3a	68 – 72 °C	85%
3b	50 – 52 °C	90%

Metodologia 3

Para a obtenção do **3c** foi testada uma metodologia adaptada utilizando o reator de micro-ondas (RAYAR *et al.*, 2015). 1 mmol do aldeído 1 mmol de nonanona (0,1423 g) e 3 mmol de NaOH foram adicionados no tubo de reação e dissolvidos com 3 mL de etanol (figura 19). A mistura foi agitada e aquecida sob pressão em reator de microondas a 100 °C por 1 hora. A reação levou a obtenção de uma quantidade mínima de produto, o que dificultou o cálculo do rendimento e a caracterização estrutural.

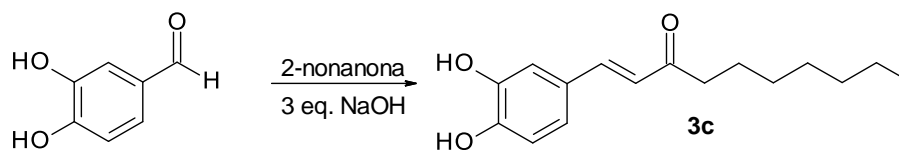


Figura 19: Rota sintética adaptada em micro-ondas para o composto **3c**.

4.2.4. Compostos Hidroxilados

Partindo do composto carbonílico como reagente de partida, o derivado hidroxilado foi obtido através da redução por boroidreto de sódio (ZEYNIZADEH, BEHYAR, 2005).

Metodologia 1

Em um balão de fundo redondo, 3 mmol de boroidreto de sódio (0,1135 g) foram dissolvidos em 5mL de ácido acético glacial, para a formação *in situ* de STAB. Após a evolução de gases, 1 mmol da cetona α,β -insaturada **3a** foi adicionado. A mistura ficou sob agitação por 2 horas (figura 20), e à solução obtida, foram adicionados 10mL de diclorometano. A mistura foi lavada com 3x10 mL de solução saturada de

NaHCO₃, e a fase orgânica foi separada, secada com Na₂SO₄ anidro e evaporada. O rendimento reacional foi de 93%.

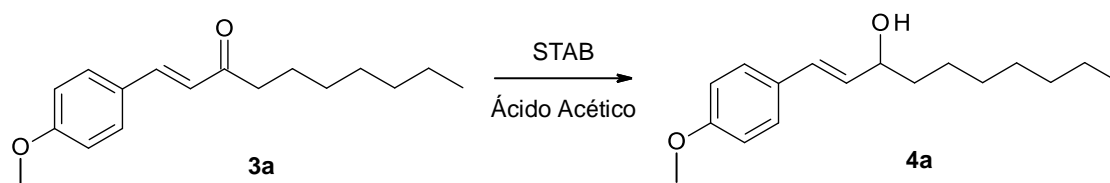


Figura 20: Metodologia adaptada de Zeynizadeh e Behyar (2005).

Metodologia 2

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 1 mmol da cetona (**3a** ou **3b**) em 10 mL de metanol em banho de gelo (figuras 21). Em seguida, foram adicionados lentamente 3 mmol de boroidreto de sódio à mistura, e após a evolução de gases, a reação prosseguiu por duas horas a temperatura ambiente. Ao final da reação, o metanol foi evaporado e ao resíduo obtido foram adicionados 10 mL de diclorometano. A mistura foi lavada com 3x10 mL de solução saturada de NaHCO₃. A fase orgânica foi separada, secada com Na₂SO₄ anidro e evaporada. Os rendimentos reacionais são apresentados na tabela 6.

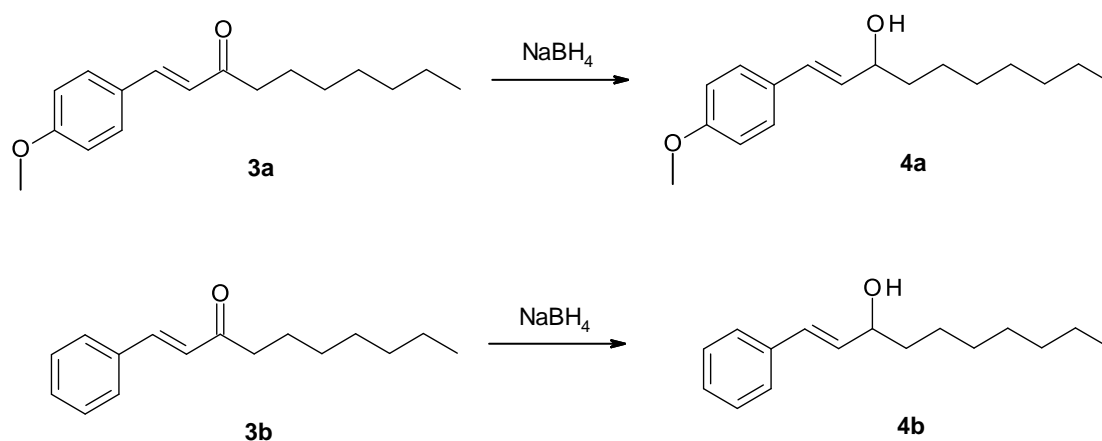


Figura 21: Metodologia adaptada de Zeynizadeh e Behyar (2005).

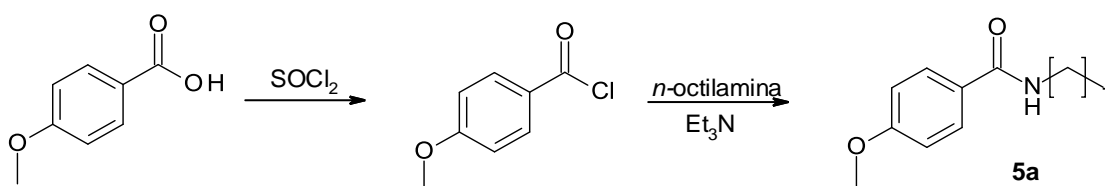
Tabela 6: Rendimentos dos compostos **4a** e **4b**.

Composto	Rendimento
4a	82%
4b	90%

4.2.5. Amidas

Metodologia 1

Em um balão de 50 mL, 5mmol ácido 4-metoxibenzoico (0,7608 g) foram dissolvidos em 10mL de solvente apropriado (tabela 7), e a seguir, 10mmol de cloreto de tionila (1,189g) foram adicionados. Após duas horas de reação sob refluxo, o solvente foi evaporado, e 5mmol de 1-octilamina (0,6462 g) e 2mL de trietilamina previamente dissolvidos em 3 mL de diclorometano foram adicionados lentamente (figura 22). A reação prosseguiu por 24 horas a 60°C. A seguir, a solução foi lavada 3 vezes com solução de ácido clorídrico 0,1M e solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi separada, seca com Na₂SO₄ anidro e evaporada. Os rendimentos são mostrados na tabela 6. O produto final foi purificado por recristalização em metanol/água e a faixa de fusão do sólido obtido foi 67-68 °C.

**Figura 22:** Metodologia adaptada de Fernandes *et al.* (2013).**Tabela 7:** Variações na metodologia 1.

Solvente	Rendimento
Tolueno	72%
THF	43%
Diclorometano	22%

Metodologia 2

Em um balão de fundo redondo, 5mmol de cloreto de benzoíla (0,7029 g), 5mmol de 1-octilamina (0,6462 g) e 3mL de trietilamina foram adicionados em 10mL de diclorometano (figura 23). A mistura foi aquecida em refluxo por 3 horas, e ao final a mistura foi lavado duas vezes com 10mL de solução de NaHCO₃ e 10 mL de água e a fase orgânica foi secada com Na₂SO₄ anidro e evaporada. O rendimento da reação foi 20%.

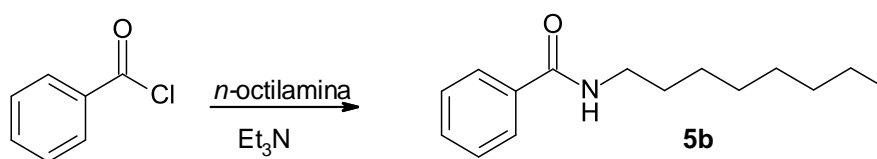


Figura 23: Metodologia adaptada de Fernandes *et al.* (2013).

Metodologia 3

A síntese do composto **5c** foi realizada de forma semelhante à metodologia 1, partindo do ácido protocatecuíco (4 mmol – 0,6157g) reagindo com 6 mmol de cloreto de tionila (0,7420 g), em 3 mL tetraidrofurano (THF). A reação (figura 24) prosseguiu sob agitação e refluxo por 3 horas e em seguida, foi adicionada uma mistura com 2 mmol de 1-octilamina (0,2646 g), 2 mL de trietilamina em 2 mL de THF e deixado em refluxo *overnight*. O solvente foi evaporado e o resíduo foi redissolvido em 15 mL de diclorometano e lavado com 5x10 mL de solução saturada de NaHCO₃. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e evaporada. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel e hexano:acetato de etila (1:1) como fase móvel. O rendimento obtido foi de 55% e a faixa de fusão do sólido obtido foi de 119-121 °C.

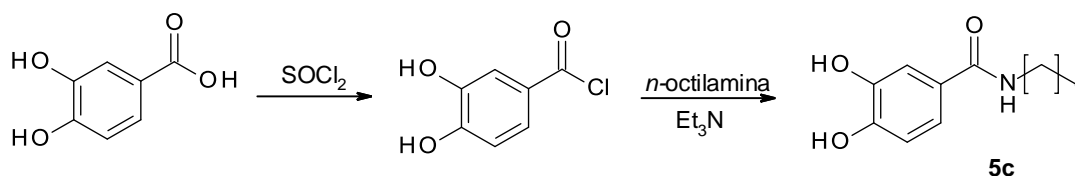


Figura 24: Metodologia adaptada de Fernandes *et al.* (2013).

4.2.6. Ésteres

Metodologia 1

Em um balão de fundo redondo equipado com aparato de Dean-Stark, foram adicionados o ácido correspondente (4-metoxibenzoico – **6a**; vanílico – **6d**), 1-octanol e 0,1mL de ácido sulfúrico concentrado em tolueno (tabela 8). A reação foi conduzida sob agitação magnética e aquecimento em refluxo por 4 horas (figura 25). Ao final da reação, a mistura foi lavada com 3x10mL de solução de NaHCO₃ e água destilada. A fase orgânica foi separada, secada com Na₂SO₄ anidro e evaporada. Os rendimentos obtidos estão na tabela 9.

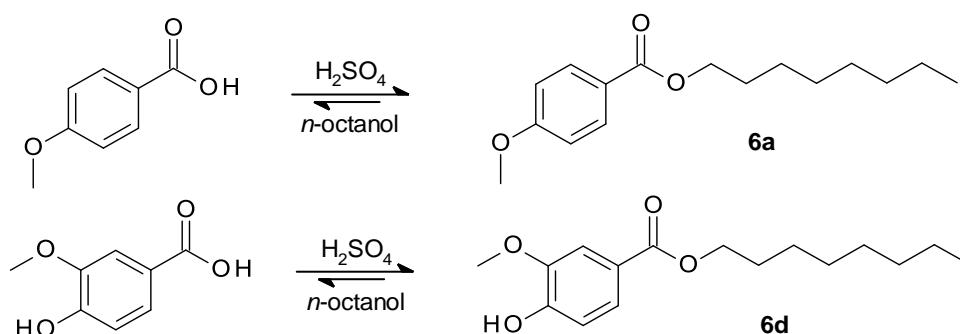


Figura 25: Metodologia adaptada de Owen *et al.* (2002).

Tabela 8: Rendimentos da metodologia 1 para preparação dos compostos **6a** e **6d**.

Composto	Ácido	1-Octanol	Rendimento
6a	10 mmol	5 mmol	13%
6d	1 mmol	1,2 mmol	56%

Metodologia 2

Em um balão de 50 mL foram adicionados 5 mmol do ácido 4-metoxibenzoico (0,7608 g) em 5 mL de tolueno e 0,5 mL de cloreto de tionila. Após 3 horas de reação, foram adicionados 5 mmol de 1-octanol (0,6512 g) e 2 mL de trietilamina (figura 26). A mistura reacional foi lavada três vezes com solução saturada de NaHCO₃. A fase

orgânica foi separada, secada com Na_2SO_4 anidro e evaporada. Obteve-se rendimento de 61%.

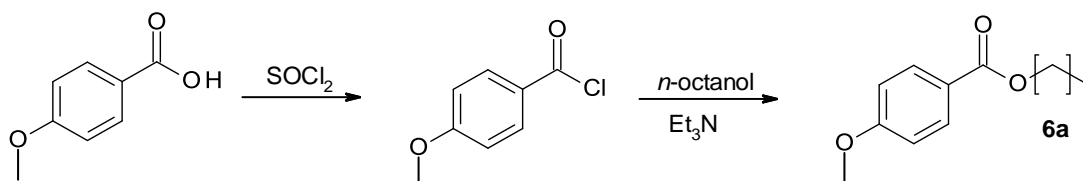


Figura 26: Metodologia adaptada de Fernandes *et al.* (2013).

Metodologia 3

Em um frasco de micro-ondas foram adicionados 1,5 mmol do ácido correspondente (4-metóxiibenzoico – **6a**; 3,4-diidróxiibenzoico – **6c**) e 1 mmol de 1-octanol em 3 mL de THF e 0,2 mL de ácido sulfúrico concentrado (figuras 27). A mistura foi submetida a aquecimento e agitação em reator de micro-ondas por 1 hora a 100 °C (PATHAK *et al.*, 2016). Ao final, a mistura foi lavada com 5x10 mL de solução de NaHCO_3 e a fase orgânica foi separada, secada com Na_2SO_4 anidro e evaporada. O composto **6c** é um sólido com faixa de fusão entre 94-96 °C. Os rendimentos obtidos estão na tabela 9.

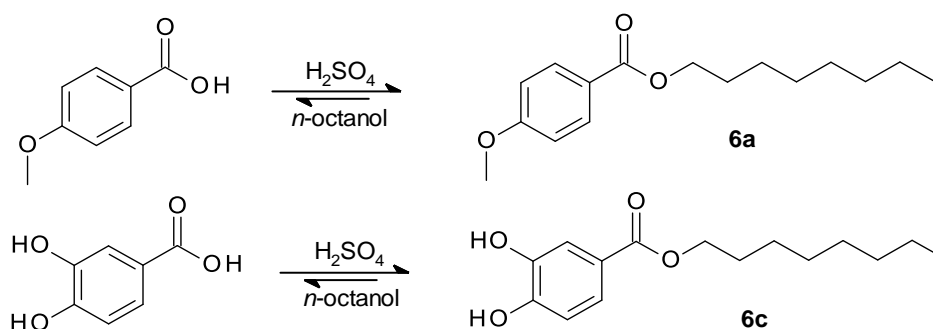


Figura 27: Metodologia adaptada de Pathak *et al.* (2016).

Tabela 9: Rendimentos da metodologia 3 para preparação dos compostos **6a** e **6c**.

Composto	Rendimento
6a	35%
6c	55%

Metodologia 4

Em um balão de fundo redondo foram colocados 5mmol de cloreto de benzoíla (0,7029 g), 5mmol de 1-octanol (0,6512 g) e 2mL de trietilamina em 10mL de diclorometano (figura 28). A mistura foi aquecida em refluxo por 3 horas e, ao final do processo, a mistura foi lavada com 2x10mL de solução de NaHCO₃ e 10mL de água destilada. A fase orgânica foi separada, secada com Na₂SO₄ anidro e evaporada. O rendimento obtido foi de 33%.

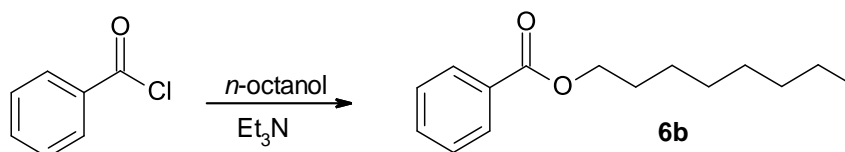


Figura 28: Metodologia adaptada de Fernandes *et al.* (2013).

4.3. Parasitas e células

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram cultivados em células LLC-MK2 com meio RPMI-1640, suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) a temperatura de 37 °C em estufa com 5% CO₂ (KESPER *et al.*, 2000). Fibroblastos de camundongos NCTC (L929 ATCC) foram cultivados em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SFB e mantidos à temperatura de 37 °C em estufa a 5% de CO₂. Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas por meio de lavagem com tampão fosfato salino (PBS) e mantidos conforme as células NCTC.

4.4. Avaliação da eficácia in vitro em *T. cruzi*

Os compostos a serem testados foram dissolvidos em DMSO, diluídos em meio de cultura em diferentes concentrações e incubados com os parasitas para se determinar as respectivas concentrações eficazes 50% (CE₅₀). A concentração do solvente por poço não ultrapassou 0,5% para não causar danos aos parasitas. Os valores de CE₅₀ foram calculados pela densidade ótica através de curvas dose-resposta sigmoidais, analisando os intervalos de confiança 95% e coeficientes lineares (r). Os compostos-teste foram avaliados comparativamente ao fármaco padrão, e estatisticamente avaliados através do teste de Mann–Whitney.

Para os ensaios de eficácia contra a forma tripomastigota, os compostos foram diluídos em série utilizando-se meio RPMI-1640, sem adição de antibióticos em placas de 96 poços e em seguida formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram adicionadas na concentração de 1×10^6 parasitas/poço. As placas foram mantidas a temperatura de 37°C em estufa com 5% de CO₂ durante 24 horas. Após esse período para a determinação da viabilidade dos parasitas, foi adicionado 20µL de Alamar Blue® a 10%. As placas permaneceram incubadas por mais 20 horas sob as mesmas condições.

Ao final do ensaio, a leitura foi realizada por absorbância em espectrofotômetro de placas (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Reader) no comprimento de onda de 570 nm (GEHRKE *et al.*, 2013). Como controle positivo (100% de células mortas), utilizou-se o fármaco padrão benznidazol, devido sua utilização na terapia clínica, e como controle negativo (100% de células vivas), utilizaram-se as células não tratadas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (GRECCO *et al.*, 2017).

Já para a avaliação da eficácia em formas amastigotas do parasita, macrófagos foram infectados na proporção de 5:1 parasitas/macrófago com formas tripomastigotas de cultura e tratados com os fármacos por 48 h a 37 °C em estufa com 5% de CO₂ (REA

et al., 2013). Após coloração com Giemsa, a CE₅₀ foi determinada por meio da contagem de 400 células infectadas e tratadas em microscópio óptico (YARDLEY, CROFT, 2000).

4.5. Determinação da citotoxicidade *in vitro* e índice de seletividade

Os compostos teste foram incubados com células NCTC clone 929 em placas de 96 poços por 48-72 horas. A viabilidade celular foi determinada pela conversão do sal metiltetrazólico (MTT) solúvel em formazana insolúvel pela ação enzimas mitocondriais (TADA *et al.*, 1986; MESQUITA *et al.*, 2014), para se obter a concentração citotóxica 50% (CC₅₀). O índice de seletividade (IS) é dado pela razão entre a toxicidade *in vitro* e a CE₅₀ nos parasitas, segundo a equação abaixo:

$$IS = CC_{50}/CE_{50} \quad \text{(Equação 1)}$$

4.6. Ensaios de alteração de permeabilidade da membrana plasmática

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* (2x10⁶ parasitas/poço) foram lavadas e incubadas com 30 µL de SYTOX[®] Green (1 µM) em placas pretas de 96 poços por 15 minutos em estufa BOD a 24 °C e posteriormente incubadas com o composto na concentração determinada para a atividade (CE₅₀). A leitura da fluorescência se deu em espectrofotômetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm. Controles internos serão utilizados com DMSO e o composto teste (MESQUITA *et al.*, 2014). Foi utilizado como controle positivo (100% de aumento na permeabilidade) o detergente Triton X100 e como controle negativo os parasitas não tratados (0% de alteração na permeabilidade).

4.7. Estudos de Relação Estrutura Atividade

Os estudos da relação entre estrutura química e propriedades físico-químicas dos compostos com a atividade antiparasitária e citotoxicidade foram realizados com base

no cálculo de eficiência de grupos e também através da análise de descritores moleculares calculados com auxílio de computador. Com esses dados, foram realizadas análise exploratória de dados através de análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos ou *clusters* (HCA). Para isso foi utilizado um computador equipado com processador Intel® Celeron Quad Core N3450, 2,2 GHz, e 4GB de memória RAM, operando com sistema operacional Windows 10®.

4.7.1. Cálculo de Eficiência de Grupos

O cálculo da eficiência de grupo (GE) é feito utilizando a equação 2:

$$GE = (1.37 \times \Delta pCE_{50}) / \Delta HA \quad (\text{Equação 2})$$

onde ΔpCE_{50} é a variação do logaritmo negativo da CE_{50} , em mol/L, entre a molécula parental e o seu derivado e ΔHA é a variação de átomos pesados entre elas (HOPKINS *et al.*, 2014).

O cálculo da GE foi realizado partindo da premissa que os compostos contendo os mesmos grupos funcionais na cadeia lateral apresentam o mesmo alvo molecular ainda desconhecido. Assim, os dados de GE foram obtidos partindo da molécula não-substituída (contendo apenas o grupo fenila) correspondente.

4.7.2. Cálculo de Descritores Moleculares

O cálculo dos descritores moleculares utilizados para a análise das REA foi realizado utilizando o servidor online Molinspiration (Molinspiration Property Calculation Service, 2015) e o software Marvin Sketch 16.1.8.0 (ChemAxon Inc.), através de suas definições padrão. O software Molinspiration foi utilizado para calcular os valores de massa molecular, coeficiente de partição ($miLogP$), número de grupos doadores (HBD) e aceptores (HBA) de ligação de hidrogênio e número de ligações rotativas.

O software Marvin Sketch 16.1.8.0 (ChemAxon Inc.) foi utilizado para o cálculo dos descritores moleculares: coeficiente de distribuição ($\log D$) nos pH 1,5, 5,0, 6,0 e 7,4, solubilidade no pH fisiológico ($\log S_{7,4}$), balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) e os descritores topológicos como área da superfície de van der Waals e volume molecular de van der Waals.

4.7.3. Análise Exploratória de Dados

As análises estatísticas utilizando as metodologias de análise por componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos ou *clusters* (HCA) foram feitas utilizando o software PAST 3.17 (HAMMER *et al.*, 2001). Para tal, foram utilizados os descritores moleculares previamente calculados, que tiveram seus valores absolutos submetidos a pré-tratamento por autoescalonamento (CORREIA, PEREIRA, 2007). Este pré-tratamento consiste em subtrair cada valor absoluto individual da média dos valores, e dividir pelo desvio-padrão da média.

Na PCA, as componentes principais (PCs) foram obtidas utilizando a matriz de variância-covariância dos *eigenvalues*, sendo a primeira delas a que explica a maior variância possível dos dados, e a segunda obtida ortogonalmente à primeira (ABDI, WILLIAMS, 2010). A seguir, os dados foram utilizados para obter um gráfico de dispersão dos valores para cada PC.

A HCA foi conduzida utilizando os mesmos descritores através do método de Ward (WARD, 1963), que produz um gráfico típico conhecido como dendograma, que explica a distribuição hierárquica das moléculas por índices de similaridade. Esse algoritmo usa a distancia Euclideana para estabelecer a relação entre as amostras/agrupamentos (FERREIRA *et al.*, 2014).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese e Caracterização dos Compostos

A síntese de iminas pode ser conduzida de diversas maneiras partindo de três reagentes: composto carbonílico, amina e catalisador ácido, geralmente ácido acético. A reação ocorre, em geral, através do ataque da amina nucleofílica ao carbono carbonílico (SOLOMONS, FRYHLE, 2012). Variações metodológicas existem na literatura, como por exemplo a reação entre um aldeído aromático e um haleto de alquila em solução de amônia (HUANG *et al.*, 2011), compatível com diversas funcionalizações no anel, tanto doadores quanto retiradores de elétrons. A retirada de água durante a reação pode aumentar o rendimento, uma vez que esta é formada durante o processo, e também pode promover hidrólise da imina formada (SMITH, MARCH, 2007).

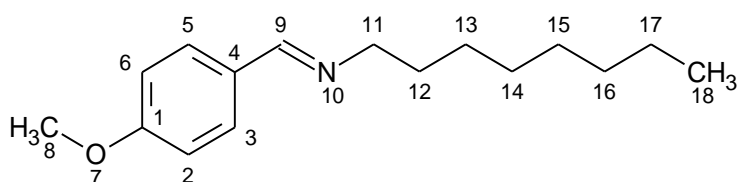
Originalmente, a metodologia incluía a utilização de peneira molecular para a retirada da água formada durante a reação, porém quando testada em laboratório, essa metodologia não foi satisfatória uma vez que a peneira molecular se desfez durante a reação, dificultando a purificação dos compostos. Sendo assim o uso da peneira foi descartado e substituído pelo uso do sulfato de sódio ao final da reação, mais barato e fácil de utilizar.

A síntese das iminas **1a** e **1b** foi realizada seguindo a metodologia adaptada de Marchand *et al.* (2009), onde a 1-octilamina é o nucleófilo que reage facilmente com os aldeídos adequados para a obtenção dos dois análogos desejados. A menor quantidade possível de solvente foi utilizada nessas reações, com intuito de apenas solubilizar os reagentes. Além disso, a separação dos produtos da mistura reacional é bastante simples, dada pela simples adsorção da água formada com sulfato de sódio anidro e posterior evaporação do solvente utilizado. Isso se explica pela espontaneidade da

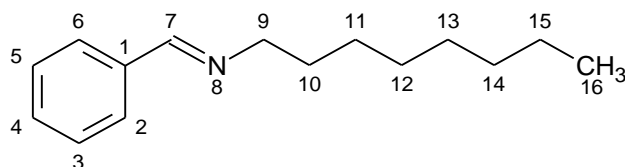
reação, que geralmente conduz a conversão quantitativa dos reagentes. Para ambos os compostos purificados e caracterizados os rendimentos foram também quantitativos.

O composto **1c**, diferentemente dos demais, não foi obtido com pureza adequada seguindo essa metodologia e a amina correspondente, **2c**, foi obtida diretamente por aminação redutiva, a ser discutida adiante.

Os compostos foram identificados utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , cromatografia gasosa (para aqueles que eram volatilizáveis) e espectrometria de massas. As estruturas químicas e respectivos dados de caracterização estão presentes ao final da discussão da parte sintética de cada grupo funcional. Todos os espectros e cromatogramas dos compostos obtidos estão no apêndice deste trabalho. Para fins de discussão, apenas alguns serão mostrados nesta seção.



1-(4-metoxifenil)-N-octil-metanimina (1a): óleo incolor. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-18); 1,20-1,40 (m, 10H, H-13/14/15/16/17); 1,68 (quint, J = 7,0 Hz, 2H, H-12); 3,56 (td, J = 7,0, 1,1 Hz, 2H, H-11); 3,83 (s, 3H, H-8); 6,88-6,95 (d, 2H, H-2/6); 7,63-7,71 (d, 2H, H-3/5); 8,19 (sl, 1H, H-9) (Apêndice 1). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 14,1 (C-18); 22,7 (C-17); 27,4 (C-13); 29,3 (C-14); 29,4 (C-15); 31,0 (C-12); 31,9 (C-16); 55,3 (C-8); 61,7 (C-11); 113,9 (C-2/6); 129,4 (C-3/5); 129,5 (C-4); 160,0 (C-9); 161,5 (C-1) (Apêndice 2). CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 15,91 min; 247 $[\text{M}]^+$ (5), 246 (12), 204 (38), 190 (100), 162 (50), 148 (65), 135 (35), 121 (76) (Apêndice 3).



1-phenil-N-octil-metanimina (1b): óleo amarelado. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-16); 1,18-1,43 (m, 10H, H-11/12/13/14/15); 1,70 (quint, J = 7,0 Hz, 2H, H-10); 3,61 (td, J = 7,0, 1,1 Hz, 2H, H-9); 7,36-7,47 (m, 3H, H-3/4/5); 7,68-7,78 (m, 2H, H-2/6); 8,27 (s, 1H, H-7) (Apêndice 4). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 14,2 (C-16); 22,8 (C-15); 27,4 (C-11); 29,4 (C-12); 29,5 (C-13); 31,0 (C-10); 31,9 (C-14); 61,9 (C-9); 128,1 (C-3/5); 128,6 (C-2/6); 130,5 (C-4); 136,3 (C-1); 160,9 (C-7) (Apêndice 5). CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 12,92 min; 217 $[\text{M}]^+$ (3), 216 (5), 174 (20), 160 (100), 132 (40), 118 (60), 91 (58) (Apêndice 6).

A obtenção de aminas pode ocorrer através do processo de aminação redutiva, onde um composto nitrogenado, como amônia ou aminas primárias ou secundárias (os nucleófilos), reage com aldeídos ou cetonas (os eletrófilos) na presença de um agente redutor. Esse tipo de reação se baseia na redução de uma imina ou ion imínio, geralmente instáveis e previamente formados por adição nucleofílica à carbonila, que são reduzidos ao derivado amina mais estável (SILVA *et al.*, 2007).

Para a síntese das aminas **2a** e **2b**, as iminas correspondentes previamente sintetizadas e purificadas foram utilizadas como material de partida, uma vez que são estáveis o suficiente para não hidrolisar rapidamente. Para tal, adaptou-se a metodologia de Abdel-Magidet *al.* (1996), obtendo-se resultados satisfatórios de rendimento e pureza.

Nessa metodologia, utilizou-se 3 equivalentes de boroidreto de sódio como agente redutor para cada equivalente do reagente a ser reduzido, na presença de ácido acético. Inicialmente, é gerado *in situ* o triacetoxiboroidreto de sódio (STAB), ao

adicionar o boroidreto de sódio lentamente ao ácido acético, que apresenta um potencial redutor mais brando que o boroidreto de sódio puro. Os grupos acetoxila inseridos ao boroidreto atuam como retiradores de elétrons, tornando a ligação boro-hidreto mais estável e menos reativa, evitando a redução de compostos menos reativos como aldeídos ou cetonas, caso a reação ocorra em um único passo(*one-pot*) (ABDEL-MAGID *et al.*, 1996).

Existe também o efeito do solvente sob a reatividade do boroidreto de sódio, sendo que dentre álcoois (metanol, etanol, isopropanol e *terc*-butanol) o metanol é o que apresenta maior taxa de redução (WARD, RHEE, 1989). Durante a realização dos experimentos foi realizado um teste utilizando o metanol como solvente, sem a prévia formação do STAB, utilizando o boroidreto de sódio diretamente na reação. O produto obtido a partir desse experimento levou a formação da amina **2b** com um rendimento maior do que àquele obtido com a metodologia acima descrita. Como o metanol é um solvente mais volátil, foi escolhido para a síntese do composto **2a**.

Como discutido anteriormente, o composto **1c** não foi isolado e assim a amina **2c** foi obtida diretamente por aminação redutiva (PATTERSON *et al.*, 2015). Isto também ocorreu para a obtenção de dois outros análogos, **2d** e **2e**, que também apresentam anel aromático 3,4-dissubstituído. Nesta metodologia, o aldeído correspondente e a 1-octilamina foram dissolvidos em metanol e reagiram por 3 horas em refluxo. Após o resfriamento, 2 equivalentes de boroidreto de sódio sólido foram adicionados à mistura, sem a prévia formação de STAB.

No espectro de ^1H de RMN de iminas, é possível identificar a formação da ligação C=N pela presença de um singlete, com integração de um hidrogênio, em torno de 8 ppm. Como as iminas obtidas foram reduzidas às aminas secundárias correspondentes, o espectro destas deve apresentar um singlete integrado para dois

hidrogênios, ligados ao carbono que fazia parte da dupla ligação. Além disso, a redução da dupla ligação desloca o sinal dos hidrogênios ligados ao outro carbono vizinho para um campo mais alto. Esses sinais podem ser observados na figura 29, onde os espectros dos compostos **1a** e **2a** estão superpostos.

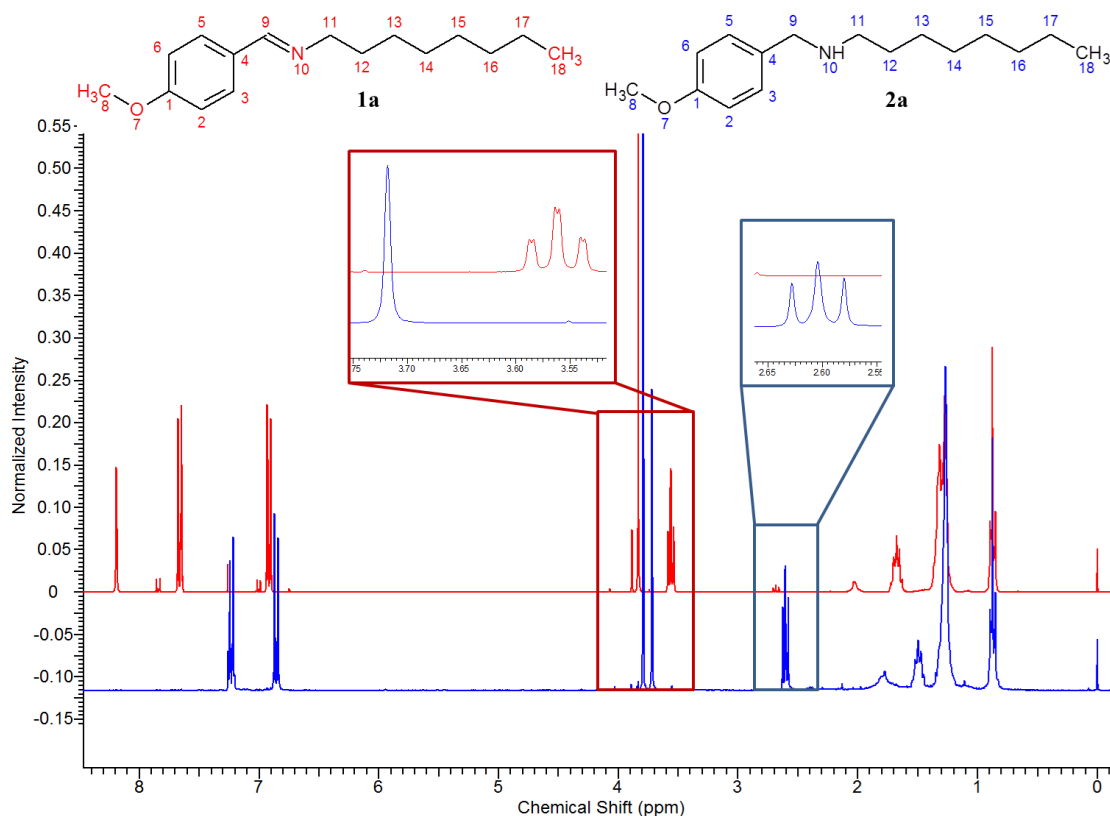
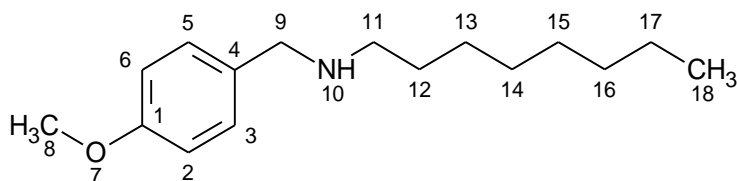
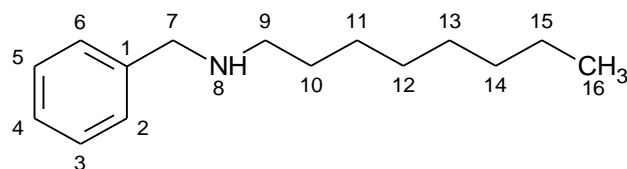


Figura 29: Espectros dos compostos **1a** (vermelho) e **2a** (azul) com destaque para os sinais dos hidrogênios 9 (~8,3 ppm – **1a**; 3,7 ppm – **2a**) e 11 (~3,5 ppm – **1a**; ~2,6 ppm – **2a**).

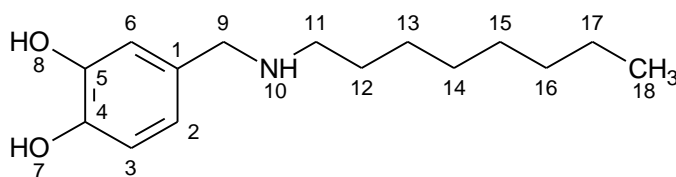


N-(4-metoxibenzil)octan-1-amina (**2a**): óleo incolor. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-18); 1,20-1,38 (m, 10H, H-13/14/15/16/17); 1,42-1,57 (m, 2H, H-12); 1,77 (sl, 1H, H-10); 2,60 (t, J = 7,2 Hz, 2H, H-11); 3,72 (s, 2H, H-9); 3,79 (s, 3H, H-8); 6,81-6,89 (m, 2H, H-2/6); 7,18-7,28 (m, 2H, H-3/5) (Apêndice 7). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 14,1 (C-18); 22,7 (C-

17); 27,4 (C-13); 29,3 (C-14); 29,5(C-15); 30,1 (C-12); 31,8 (C-16); 49,4 (C-11); 53,5 (C-9); 55,3 (C-8); 113,7 (C-2/6); 129,3 (C-3/5); 132,6 (C-4); 158,6 (C-1) (Apêndice 8).CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 15,79 min; 249 [M]⁺ (5), 190 (5), 150 (15), 137 (10), 121 (100), 77 (5)(Apêndice 9).

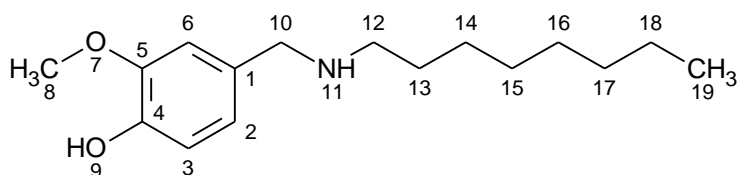


N-benzilooctan-1-amina (**2b**): óleo incolor. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 0,88 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H, H-16); 1,17-1,38 (m, 10H, H-11/12/13/14/15); 1,51 (m, 3H, H-8/10); 2,62 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, H-9); 3,79 (s, 2H, H-7); 7,20-7,38 (m, 5H, H-2/3/4/5/6) (Apêndice 10). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 14,2 (C-16); 22,7 (C-15); 27,4 (C-11); 29,4 (C-12); 29,6 (C-13); 30,1 (C-10); 31,9 (C-14); 49,6 (C-7); 54,2 (C-9); 126,9 (C-4); 128,2 (C-3/5); 128,4 (C-2/6); 140,4 (C-1) (Apêndice 11).CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 13,01 min; 219 [M]⁺ (3), 128 (9), 120 (98), 106 (15), 91 (100)(Apêndice 12).

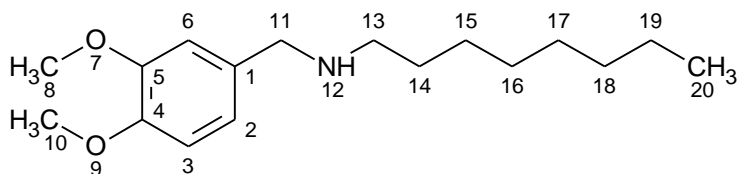


N-(3,4-diidroxibenzil)octan-1-amina (**2c**): sólido verde. Faixa de fusão 85-87 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 0,87 (t, *J* = 6,4 Hz, 3H, H-18); 1,11-1,35 (sl, 10H, H-13/14/15/16/17); 1,51 (sl, 2H, H12); 2,66 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H, H-11); 3,44-3,69 (m, 2H, H-9); 5,20 (sl., 3H, H-7, 8, 10); 6,53 (br. s., 2H, H-3/6), 6,63(d, *J* = 7,7Hz, 1H, H-2) (Apêndice 13). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO, δ = ppm, TMS) 14,4 (C-18); 22,6 (C-17); 27,3 (C-13); 29,2 (C-14) 29,4 (C-15); 29,8 (C-12); 31,8 (C-16); 48,9 (C-11); 53,2

(C-9); 115,6 (C-6); 115,9 (C-3); 119,2 (C-2); 131,9 (C-1); 144,4 (C-5); 145,4 (C-4).(Apêndice 14).



2-metoxi-4-[(octilamino)metil]fenol (2d): sólido branco. Faixa de fusão 68-72 °C. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,87 (t, J = 6,6 Hz, 3H, H-19); 1,16-1,37 (m, 10H, H-14/15/16/17/18); 1,42-1,50 (m, 2H, H13); 2,62 (t, J = 7,2 Hz, 2H, H-12); 3,71 (s, 2H, H-10); 3,89 (s, 3H, H-8); 6,73-6,91 (m, 3H, H-2/3/6) (Apêndice 15). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 14,1 (C-19); 22,7 (C-18); 27,4 (C-14); 29,3 (C-15); 29,5 (C-16); 30,0 (C-13); 31,8 (C-17); 49,5 (C-12); 53,9 (C-10); 55,9 (C-8); 110,9 (C-6); 114,2 (C-3); 121,0 (C-2); 132,3 (C-1); 144,7 (C-5); 146,7 (C-4) (Apêndice 16). CG/LRMS (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 17,33 min. 265 $[\text{M}]^+$ (3), 206 (7), 166 (10), 152 (9), 137 (100), 122 (7), 107 (10) (Apêndice 17).



N-(3,4-dimetoxibenzil)octan-1-amina (2e): óleo alaranjado. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,87 (t, J = 6,6 Hz, 3H, H-19); 1,16-1,37 (m, 10H, H-14/15/16/17/18); 1,42-1,50 (m, 2H, H13); 2,62 (t, J = 7,2 Hz, 2H, H-12); 3,71 (s, 2H, H-10); 3,89 (s, 3H, H-8); 6,73-6,91 (m, 3H, H-2/3/6) (Apêndice 18). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 14,1 (C-20); 22,7 (C-19); 27,4 (C-15); 29,3 (C-16); 29,5 (C-17); 30,1 (C-14); 31,8 (C-18); 49,5 (C-13); 53,9 (C-11); 55,8 (C-8); 55,9 (C-10); 110,9 (C-3); 111,2 (C-6); 120,2 (C-2); 133,2 (C-1); 147,9 (C-4); 148,9 (C-5) (Apêndice 19).

19).CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de 17,57 min; 279 [M]⁺ (5), 248 (5), 220 (10), 180 (7), 151 (100), 107 (5), 90 (7)(Apêndice 20).

A condensação aldólica é uma reação clássica bastante útil para a obtenção de moléculas bioativas, pois permite a síntese de compostos com o sistema com carbonila α,β -insaturada. Como exemplo, um importante grupo de compostos bioativos que apresentam essa funcionalização são as chalconas, precursoras da classe dos flavonoides, e que tem diversas funções biológicas já descritas (GUTIERREZ *et al.*, 2015; ZHUANG *et al.*, 2017). A reação se dá entre um composto carbonílico enolizável, que é o nucleófilo, e outro reagente carbonílico que atua como eletrófilo, levando a formação de uma ligação C-C de um composto β -hidroxicarbonilado (SMITH, MARCH, 2007).

A reação pode ser feita com catálise ácida ou básica, sendo que no primeiro caso a carbonila é protonada e ativada antes do ataque nucleofílico. O meio ácido favorece também a protonação da hidroxila formada, levando à eliminação de água, que forma a insaturação C-C. Já quando a reação é conduzida com catálise básica (figura 30), o uso de bases fortes, longos tempos de reação e temperaturas elevadas também favorecem a reação de desidratação do composto β -hidroxicarbonilado pela abstração do hidrogênio α -carbonílico, formando uma cetona ou aldeído α,β -insaturado (SOLOMONS, FRYHLE, 2012).

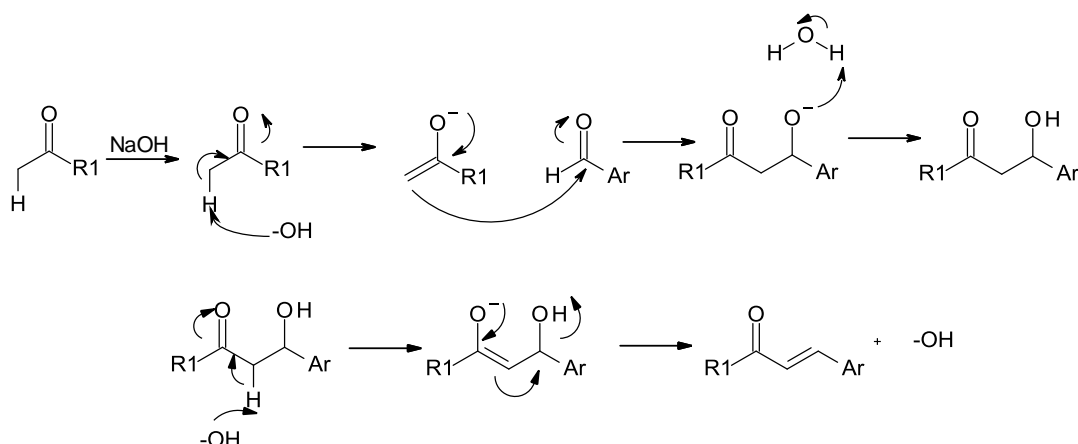


Figura 30: Mecanismo da reação de condensaçãoaldólica em meio básico seguida por desidratação.

Uma das metodologias utilizadas para a obtenção do composto **3a** foi a reação clássica feita com catálise básica, condições estas que favorecem a formação do produto de desidratação desejado, gerando a cetona correspondente. A separação do produto foi bastante simples, uma vez que pode ser facilmente cristalizado de etanol:água, e separado por filtração. Curiosamente, essa metodologia não foi favorável para a obtenção do composto **3b**. As tentativas desta abordagem geraram uma mistura complexa, e assim optou-se por outra alternativa metodológica.

Outra metodologia testada para a síntese desses compostos foi adaptada de Piste (2014) que utilizou o gral e pistilo (*grindstone chemistry*) em uma reação sem o uso de solventes no meio reacional, consistindo apenas do aldeído e da cetona correspondente e hidróxido de sódio em um gral de porcelana, que a seguir é triturado. Essa metodologia nos permitiu a obtenção do composto **3b**, que havia apresentado problemas sintéticos quando aplicada a metodologia convencional e levou a um rendimento quantitativo do produto de interesse. O composto **3a** também foi obtido com rendimento maior, de 85%.

A abordagem da *grindstone chemistry* parte do princípio que a energia mecânica fornecida e o atrito com o gral são suficientes para alcançar a energia de ativação da

reação entre os materiais de partida (BHANDARI, RAJ, 2017). Apesar de não ser aplicável para todo o tipo de reação orgânica, existem relatos da sua utilização para obtenção de chalconas, hidrazonas, oximas e enonas (ROTHENBERG *et al.*, 2001; PISTE, 2014; SANTOS FILHO, PINHEIRO, 2017).

Uma das maiores vantagens desta abordagem é o curto tempo reacional para obtenção de rendimentos bons a excelentes (RAHMAN *et al.*, 2012; PISTE, 2014), tornar a purificação dos produtos mais simples e ainda atende aos princípios da química verde, evitando o uso de solventes no processo (LENARDÃO *et al.*, 2003). Em nossa metodologia, utilizou-se apenas água e etanol como solventes, que são ambientalmente aceitáveis.

O composto **3c** apresenta duas hidroxilas no anel aromático do aldeído e, em meio básico, essas hidroxilas ácidas se tornam ionizadas. Como parte da base adicionada é consumida pela neutralização, a quantidade de base adicionada ao meio reacional foi de $n+1$, sendo n o número de hidroxilas ácidas na molécula. Assim, a metodologia foi adequada para fornecer um equivalente em excesso à neutralização para promover a catálise básica. Além disso, reação foi realizada em reator de micro-ondas, que gera alta temperatura (100 °C) sob pressão, que auxilia na desidratação do intermediário e formação da cetona α,β -insaturada correspondente. Mesmo nessa condição apenas traços do produto foram obtidos após purificação, dificultando a caracterização. Possivelmente, a formação do fenolato no meio básico reduz a reatividade do aldeído de forma significativa, deixando o carbono carbonílico menos eletrofílico o que dificulta a reação.

No espectro de RMN de ^1H dos compostos **3**, os sinais dos hidrogênios vinílicos devem estar presentes e integrados para um hidrogênio cada. Observa-se na figura 31 o

espectro do composto **3a** com destaque para o sinal do H-10, com constante de acoplamento 16,3 Hz indicando que o composto obtido é o isômero *trans*. O sinal do H-9 está sobreposto com os sinais dos hidrogênios 3/5 do anel aromático.

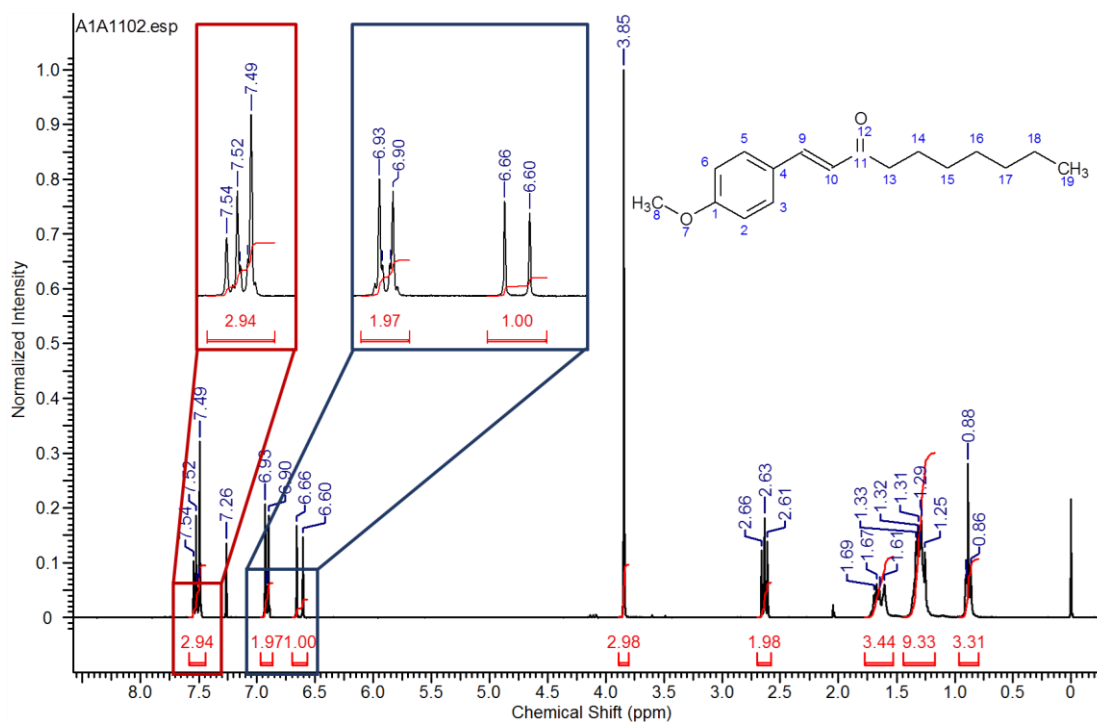
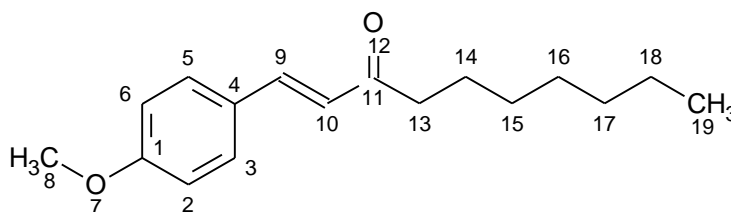
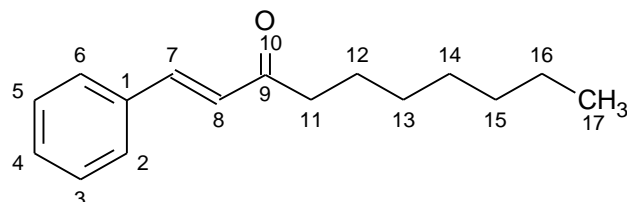


Figura 31: Espectro de ^1H -RMN do composto **3a**. Os sinais destacados correspondem aos hidrogênios 9 (~7,5 ppm), sobreposto com o sinal dos hidrogênios aromáticos 3/5, e 10 (6,63 ppm).



(1*E*)-1-(4-metóxfenil)dec-1-en-3-ona (**3a**): sólido branco. Faixa de fusão 67-71 °C. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-19); 1,20-1,40 (m, 8H, H-15/16/17/18); 1,56-1,63 (m, 2H, H-14); 2,63 (t, J = 7,4 Hz, 2H, H-13); 3,85 (s, 3H, H-8); 6,63 (d, J = 16,3 Hz, 1H, H-10); 6,90-6,93 (d, J = 9 Hz, 2H, H-2/6); 7,52 (m, 3H, H-3/5/9) (Apêndice 21). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 14,1 (C-19); 22,7 (C-18); 24,6 (C-14); 29,1 (C-15); 29,4 (C-16); 31,7 (C-17); 40,9 (C-13);

55,4 (C-8); 114,4 (C-2/6); 124,2 (C-10); 127,3 (C-4); 129,9 (C-3/5); 142,1 (C-9); 161,5 (C-1); 200,8 (C-11) (Apêndice 22).CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 18,76 min; 260 [M]⁺ (10), 176 (32), 161 (100), 145 (30), 133 (29), 121 (25)(Apêndice 23).



(1E)-1-fenildec-1-en-3-ona (**3b**): sólido branco. Faixa de fusão 50-52 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 0,87 (m, 3H, H-17); 1,10-1,42 (m, 10H, H-12/13/14/15/16); 1,60-1,71 (m, 2H, H-12); 2,66 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, H-11); 6,75 (d, *J* = 16,3 Hz, 1H, H-8); 7,36-7,43 (m, 3H, H-3/4/5); 7,50-7,62 (m, 3H, H-2/6/7) (Apêndice 24). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 14,1 (C-17); 22,64 (C-16); 24,4 (C-12); 27,4 (C-13); 29,3 (C-14); 31,7 (C-15); 41,0 (C-11); 126,30 (C-8); 128,3 (C-2/6); 128,9 (C-3/5); 134,6 (C-4); 142,3 (C-1); 147,6 (C-7); 170,6 (C-9) (Apêndice 25).CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 15,59 min; 230 [M]⁺ (5), 159 (5), 146 (60), 131 (100), 117 (15), 103 (49), 77 (25)(Apêndice 26).

Para a redução dos compostos **3a** e **3b** obtenção dos correspondentes **4a** e **4b**, respectivamente, foi utilizada a clássica metodologia de redução utilizando hidreto metálico como boroidreto de sódio (WARD, RHEE, 1989; ZEYNIZADEH, BEHYAR, 2005; SMITH, MARCH, 2007).

A utilização de hidretos metálicos na redução de compostos carbonílicos α,β-insaturados pode levar a obtenção de dois produtos: álcool alílico (redução 1,2 - cinética) ou cetona saturada (redução 1,4 - termodinâmica). (ZEYNIZADEH, SHIRINI, 2003). Em nossos procedimentos, foi observado que apenas o produto de redução 1,2

(ou seja, da carbonila) foi obtido, não sendo observada a formação do produto de redução 1,4 (hidrogenação do carbono β). Assim, o processo pode ser considerado regioseletivo (figura 32).

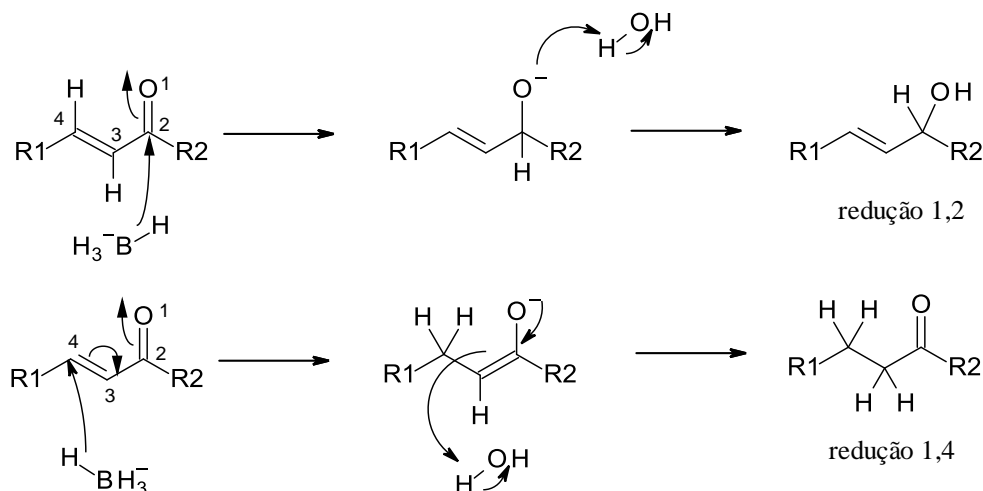


Figura 32: Esquema dos possíveis pontos de redução em compostos carbonílicos α,β -insaturados com boroidreto de sódio.

Inicialmente foram realizados testes utilizando como solvente o ácido acético glacial e com a prévia formação de STAB e com a utilização de boroidreto de sódio. Como as condições de redução podem ser mais branda quando se utiliza STAB como agente redutor, esperava-se que a distribuição de produtos pudesse ser diferente de quando se utiliza boroidreto de sódio. Hipotetizou-se que o poder redutor do boroidreto fosse suficiente para produzir a redução 1,4, e assim o uso de STAB poderia favorecer o produto de redução 1,2. Entretanto, o produto obtido em ambos os casos foi o álcool α,β -insaturado e os rendimentos foram excelentes. Assim, optou-se por utilizar a metodologia mais simples.

Algumas metodologias propõem que o uso de sais metálicos na redução de enonas com boroidreto de sódio leve a uma seletividade de obtenção do produto da redução 1,2 (GEMAL, LUCHE, 1981). Uma metodologia clássica para obter esse

resultado é a redução de Luche (LUCHE, RODRIGUEZ-HAHN, CRABBÉ, 1978) que utiliza cloreto de cério hexahidratado (2.5 equivalentes) dissolvido em metanol na presença de boroidreto de sódio e do composto a ser reduzido (1 equivalente de cada). Com o procedimento descrito neste trabalho houve formação apenas do produto de redução 1,2, possivelmente devido à presença do anel aromático, que leva ao efeito de conjugação com a dupla ligação alifática C=C, aumentando a estabilidade desta ligação. Assim, nesse caso não foi necessária a adição de um sal metálico para obtenção quimioseletiva de um dos produtos.

No espectro de RMN de ^1H de **4a** (figura 33) observa-se o dubleto do H-9 em aproximadamente 6,5 ppm e o duplo dubleto do H-10 em 6,07 ppm, identificados devido ao acoplamento *trans* entre eles ($J_{\text{trans}} = 15,9$ Hz). A redução da carbonila se confirma pelo acoplamento entre o H-10 e o agora presente H-11 ($J = 7,1$ Hz), sendo este um quarteto de deslocamento 4,3 ppm. Além disso, observa-se em 3,8 ppm sinal característico da metoxila do anel aromático.

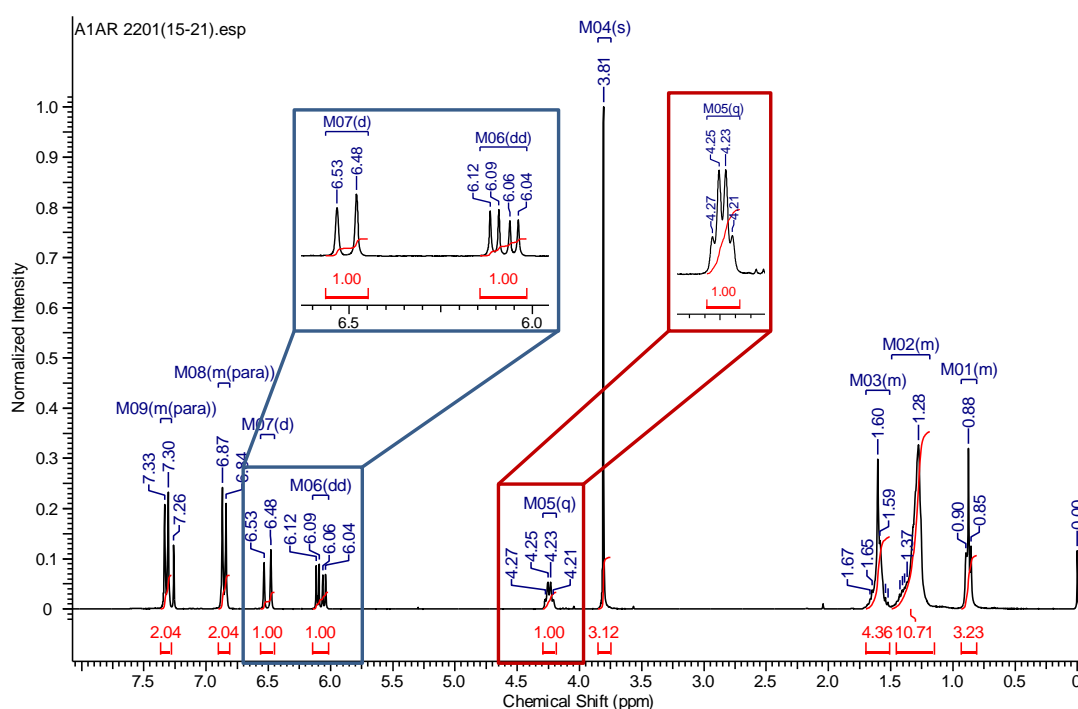
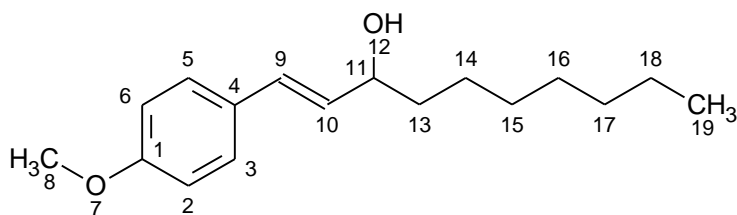
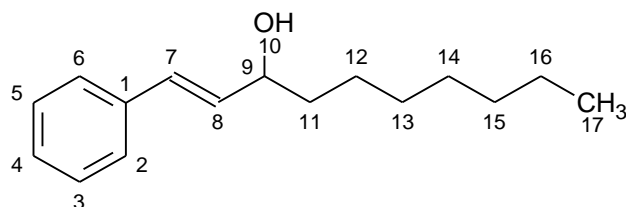


Figura 33: Espectro de ^1H -RMN do composto **4a**. Os sinais destacados correspondem aos hidrogênios 9 (6,50 ppm), 10 (6,07 ppm) e 11 (4,23 ppm).



(1E)-1-(4-metóxfenil)dec-1-en-3-ol(**4a**): óleo incolor. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-19); 1,20-1,48 (m, 10H, H-14/15/16/17/18); 1,50-1,68 (m, 2H, H-13); 3,81 (s, 3H, H-8); 4,24 (q, J = 7,1 Hz, 1H, H-11); 6,08 (dd, J = 15,9, 7,1 Hz, 1H, H-10); 6,51 (d, J = 15,9 Hz, 1H, H-9); 6,81-6,88 (m, 2H, H-2/6); 7,28-7,34 (m, 2H, H-3/5) (Apêndice 27). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 14,1 (C-19); 22,7 (C-18); 25,5 (C-14); 29,3 (C-15); 29,6 (C-16); 31,8 (C-17); 37,5 (C-13); 55,3 (C-8); 73,32 (C-11); 114,0 (C-2/6); 127,6 (C-10); 129,5 (C-4); 129,8 (C-3/5); 130,5 (C-9); 159,2 (C-1) (Apêndice 28). CG/ LRMS (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 18,10 min; 262 $[\text{M}]^+$ (10), 246 (10), 173 (8), 163 (12), 147 (45), 134 (30), 121 (100), 108(10), 91 (15). 77 (10) (Apêndice 29).



(1E)-1-fenildec-1-en-3-ol(**4b**): óleo incolor. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-17); 1,15-1,49 (m, 10H, H-12/13/14/15/16); 1,51-1,72 (m, 2H, H-11); 4,19-4,34 (m, 1H, H-9); 6,25 (dd, J = 15,9, 7,1 Hz, 1H, H-8); 6,57 (d, J = 15,9 Hz, 1H, H-7); 7,17-7,44 (m, 5H, H-2/3/4/5/6) (Apêndice 30). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 14,1 (C-17); 22,6 (C-16); 25,5 (C-12); 29,3 (C-14); 29,6 (C-13); 31,8 (C-15); 37,4 (C-11); 73,1 (C-9); 126,5 (C-2/6); 127,6 (C-3/5); 128,6 (C-4); 130,2 (C-8); 132,6 (C-7); 136,8 (C-1). (Apêndice 31). CG/ LRMS (EI) m/z (int. rel.%):

tempo de retenção 15,27 min; 232 [M]⁺ (3), 214 (30), 143 (37), 133 (100), 115 (47), 105 (42), 91 (50), 77 (20), 55 (30), 41 (15)(Apêndice 32).

É possível notar na figura 34, onde os espectros de **3a** (azul) e **4a** (vermelho) estão sobrepostos, que a redução da carbonila leva a um deslocamento dos sinais para campo mais alto, indicando uma maior blindagem desses hidrogênios. Isso ocorre devido ao efeito eletrônico da carbonila (retirador de elétrons) sobre os hidrogênios adjacentes a ela, deixando-os mais desblindados.

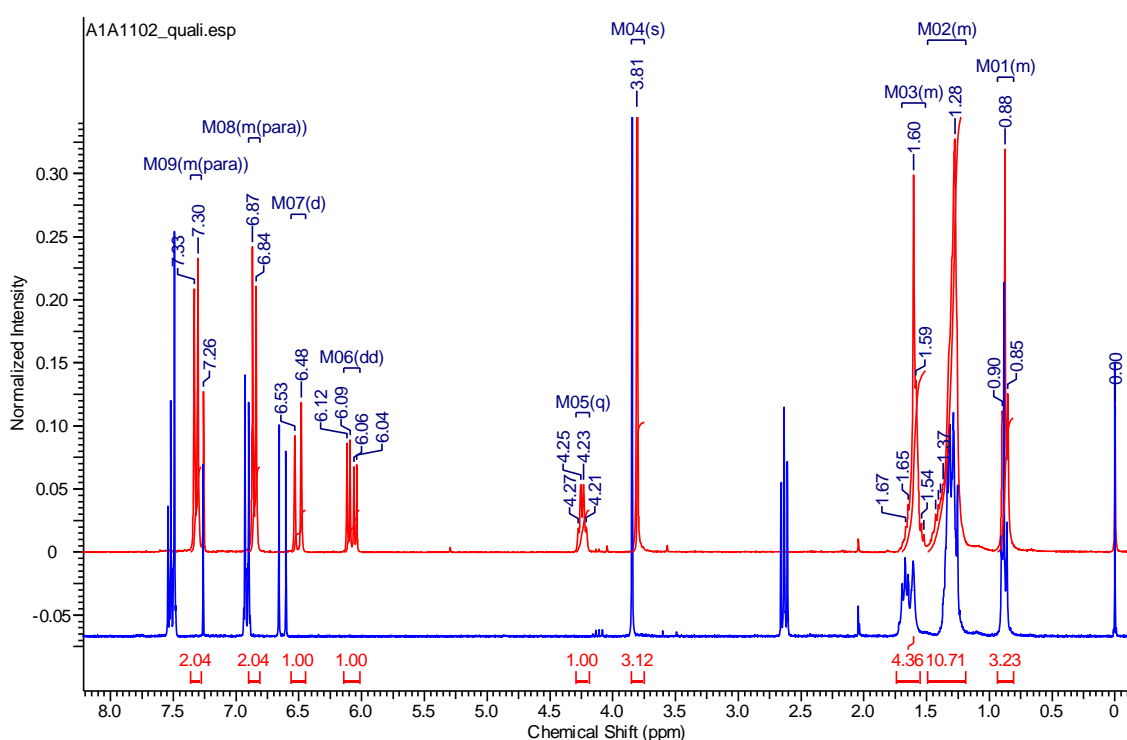


Figura 34: Espectros de ¹H-RMN dos compostos **3a** e **4a**.

Existem diversas formas de síntese de amidas sendo uma delas a reação de Ritter (RITTER, MINIERI, 1948), onde um alceno reage com uma nitrila, utilizando ácido sulfúrico concentrado como catalisador. O intermediário formado, íon nitrílio, é então hidrolisado na presença de água formando a amida desejada. É possível também a reação com o cloreto de ácido, obtido comercialmente quando disponível ou gerado *in situ* pela reação entre o ácido carboxílico desejado e cloreto de tionila, e uma amina (SOLOMONS, FRYHLE, 2012).

O composto **5a** foi preparado através da formação prévia do cloreto de ácido partindo do ácido anísico. Três solventes foram testados para dissolução do ácido anísico: diclorometano, tetraidrofurano e tolueno, sendo este último o que forneceu melhores resultados devido à melhor solubilidade do ácido neste. Isso é importante, pois para que haja a reatividade adequada (figura 35), o ácido precisa estar dissolvido no meio reacional, possibilitando o ataque do oxigênio no enxofre do cloreto de tionila. A seguir, adicionou-se a base e a amina reagente, seguindo a metodologia adaptada de Fernandes *et al.* (2013).

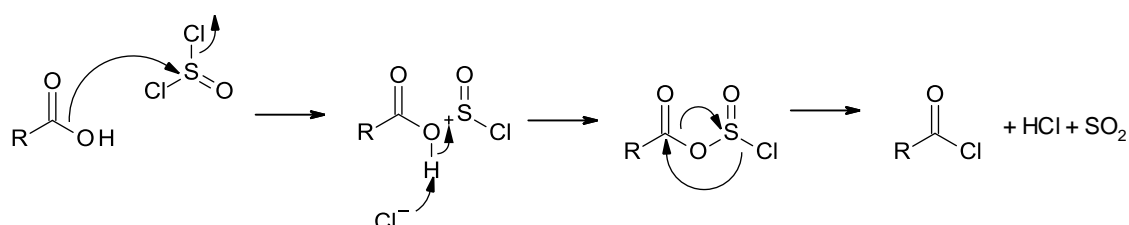
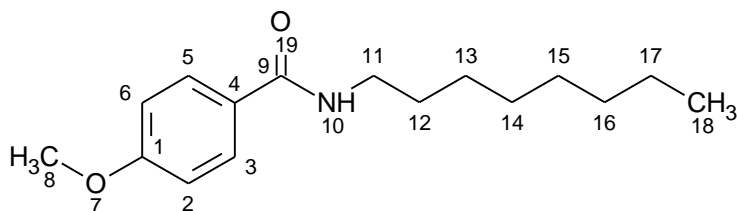


Figura 35: Formação do Cloreto de Ácido.

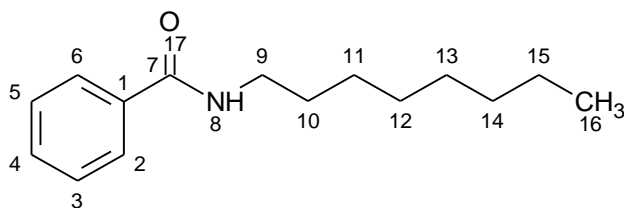
Buscando na literatura, é proposta uma metodologia diferente para a síntese desta mesma amida (**5a**), feita através da amino-carbonilação de 4-iodoanisol, que age como eletrófilo, reagindo com a octilamina em reator de micro-ondas. Essa metodologia utilizava como catalisador da reação um complexo de β-ciclodextrina e paládio, levando a rendimentos de 93%, ou com acetato de paládio, com rendimento de 70% (GAUDINO *et al.*, 2015). Como esses materiais são caros e exigem condições específicas, optamos pela metodologia de aminólise do cloreto de ácido.

No caso da preparação do composto **5b**, a reação partiu do cloreto de benzoíla, disponível comercialmente, não sendo necessária a formação prévia do cloreto de acila correspondente, tornando a reação mais simples e com apenas um passo reacional. Apesar do rendimento final da reação não ter sido alto, a purificação da mistura foi simples e levou a obtenção de um produto puro.

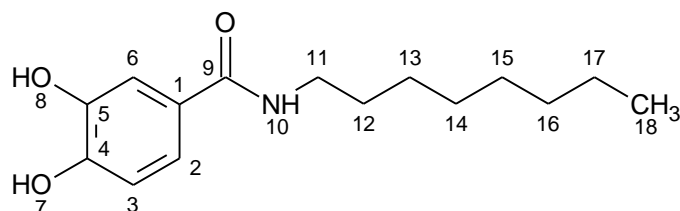
A síntese do composto **5c** seguiu a mesma metodologia de formação de cloreto de ácido a partir do ácido 3,4-diidroxibenzóico e cloreto de tionila numa proporção de 1,5:1 equivalentes, de forma a garantir a total conversão do ácido. Houve também a troca do solvente de tolueno por tetraidrofurano para garantir a melhor dissolução do ácido, cuja importância já foi discutida.



4-metóxin-octilbenzamida (5a): sólido bege. Faixa de fusão 67-68 °C. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,8 Hz, 3H, H-18); 1,22-1,41 (m, 10H, H-13/14/15/16/17); 1,55-1,66 (m, 2H, H-12) 3,46 (m, 2H, H-11); 3,85 (s, 3H, H-8); 6,02 (sl, 1H, H-10); 6,93 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-2/6); 7,73 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-3/5) (Apêndice 33) ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 14,1 (C-18); 22,7 (C-17); 27,0 (C-13); 29,2 (C-12); 29,3 (C-14); 29,8 (C-15); 31,8 (C-16); 40,1 (C-11); 55,40 (C-8); 113,7 (C-2/6); 127,20 (C-3/5); 128,6 (C-4); 162,1 (C-1); 167,0 (C-9) (Apêndice 34).CG/ LRMS (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 19,56 min; 263 $[\text{M}]^+$ (12), 206 (10), 164 (17), 151 (15), 135 (100), 107 (10), 77 (12)(Apêndice 35).



n-octilbenzamida (**5b**): óleo incolor.¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 0,81 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H, H-16); 1,11-1,34 (m, 10H, H-11/12/13/14/15); 1,44-1,67 (m, 2H, H-10); 3,38 (dt, *J* = 7,2, 1,4 Hz, 2H, H-9); 6,08 (sl, 1H, H-8); 7,19-7,41 (m, 3H, H-3/4/5); 7,67-7,71 (m, 2H, H-2/6) (Apêndice 36).¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 14,1 (C-16); 22,7 (C-15); 27,0 (C-11); 28,8 (C-10); 29,2 (C-12); 29,7 (C-13); 31,8 (C-14); 40,1 (C-9); 126,8 (C-3/5); 128,5 (C-2/6); 131,3 (C-1); 134,9 (C-4); 167,5 (C-7) (Apêndice 37).CG/ LRMS (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 16,29 min; 233 [M]⁺ (9), 176 (12), 162 (10), 148 (15), 134 (30), 105 (100), 77 (27)(Apêndice 38).



3,4-diidroxi-*n*-octilbenzamida (**5c**): sólido branco. Faixa de fusão 119-121 °C¹H-RMN (300 MHz, DMSO, δ = ppm, TMS) 0,85 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H, H-18); 1,21-1,33 (m, 10H, H-13/14/15/16/17); 1,40-1,56 (m, 2H, H-12); 3,13-3,21 (m, 2H, H-11); 6,73 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H-3); 7,16 (dd, *J* = 8,2, 2,1 Hz, 1H, H-2); 7,26 (d, 1H, H-6); 8,08 (t, *J* = 5,55 Hz, 1H, H-10); 9,40 (sl, 2H, H-7/8)(Apêndice 39).¹³C-RMN (75 MHz, DMSO, δ = ppm, TMS) 14,4 (C-18); 22,5 (C-17); 27,0 (C-13); 29,1 (C-12); 29,2 (C-14); 29,7 (C-15); 31,7 (C-16); 39,5 (C-11); 115,2 (C-3); 115,5 (C-6); 119,3 (C-2); 126,5 (C-4); 145,2 (C-5); 148,6 (C-4); 166,4 (C-9) (Apêndice 40).

Assim como as amidas, ésteres também podem ser obtidos pela reação de um haleto de ácido com um álcool (FERNANDES *et al.*, 2014; MATSUMOTO *et al.*, 2014). Outra metodologia é a reação de transesterificação (OTERA, 1993) onde um éster é convertido em outro, sendo bastante útil quando o ácido carboxílico

correspondente é muito lábil para gerar o éster desejado através da reação direta com o álcool. A hidrólise de anidridos, gerando um ácido carboxílico e um éster, assistida por microondas (BANDGAR, *et al.*, 2006), também é uma opção para o preparo de compostos acetilados ou de outros anidridos facilmente disponíveis, por exemplo.

A obtenção do composto **6a** foi testada com a formação *in situ* do cloreto de ácido a partir ácido anísico dissolvido em THF, seguida da adição de uma mistura do octanol e trietilamina no mesmo solvente. Porém, o espectro de ^1H -RMN mostrou que a amostra obtida era uma mistura complexa que não pôde ser adequadamente purificada.

Considerando o problema encontrado, foram testadas outras formas de obtenção dos ésteres e a metodologia escolhida foi a esterificação de Fischer catalisada por ácido sulfúrico concentrado. Nesse caso, o aparato de Dean-Stark foi utilizado para possibilitar a retirada de água por destilação azeotrópica no decorrer da reação. Essa abordagem favorece o rendimento, uma vez que a esterificação catalisada por ácido é uma reação em equilíbrio (figura 36) e a retirada da água do meio desloca o equilíbrio no sentido de formação de produto e dificulta a hidrólise da ligação pela água formada (OWEN *et al.*, 2002).

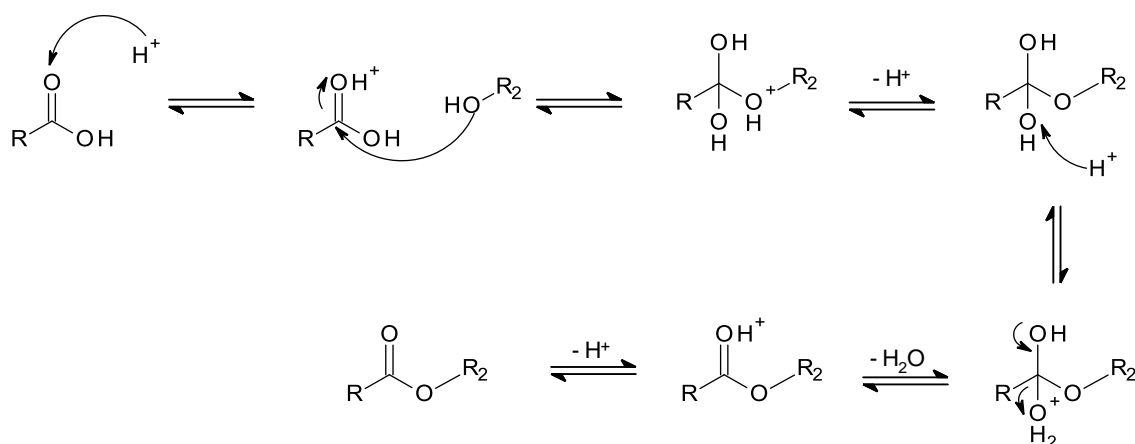
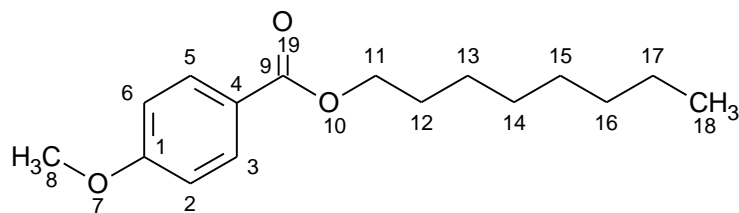


Figura 36: Esquema geral da esterificação de Fischer. Adaptada de Fernandes *et al.*, 2013.

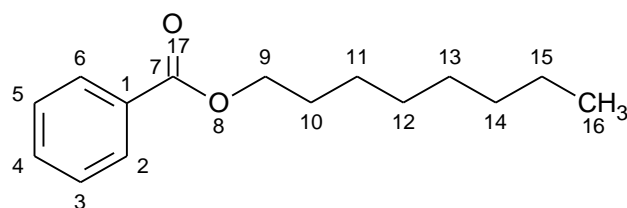
Outra forma de obtenção de ésteres é através da reação entre um ácido carboxílico e álcool na presença de agentes condensantes como DCC (N,N'-dicicloexilcarbodiimida) ou EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida). De forma geral, esse agente reage com o ácido formando um intermediário com um grupo de saída melhor que a água. O agente condensante DCC gera ao final da reação um produto, DCU (N,N'-dicicloexilureia), que é solúvel em vários solventes e dificulta a purificação. Essa metodologia é bastante utilizada para a obtenção de ésteres a partir de álcoois com maior impedimento estérico (SMITH, MARCH, 2007).

Pathak *et al.* (2016) reportaram a formação do éster **6a** usando metodologia com trifenilfosfina e iodo molecular sob irradiação de micro-ondas por 17 minutos a 85 °C, obtendo um rendimento de 93%. Esse procedimento tem o apelo da química verde, uma vez que a irradiação de micro-ondas acelera bastante o processo e tem um menor gasto de solvente e energia. A metodologia foi adaptada para a obtenção dos ésteres **6a** e **6c** utilizando como catalisador o ácido sulfúrico concentrado e THF como solvente. Como a reação de esterificação é endotérmica, a utilização do micro-ondas é útil, pois permite aquecimento com maior eficiência e melhor controle da temperatura no meio reacional. Os compostos foram obtidos com sucesso e o composto **6a** foi obtido com um rendimento maior do que na metodologia clássica, anteriormente discutida.

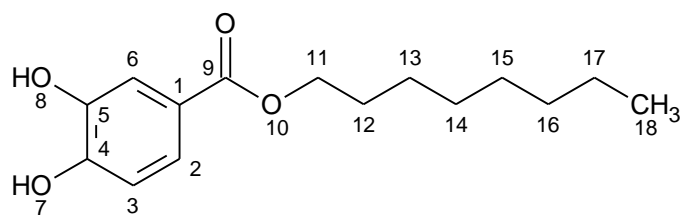
Assim como realizado na síntese do composto **5b**, o éster **6b** foi preparado utilizando o cloreto de benzoíla como reagente além do álcool octílico no lugar da 1-octilamina. A metodologia é bastante simples e de fácil isolamento do produto de interesse, o que justifica sua escolha. Além disso, a quantidade de produto puro foi suficiente para caracterização e avaliação biológica.



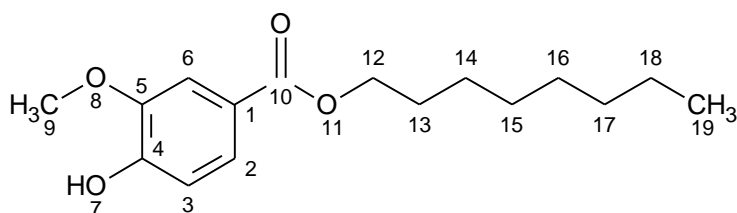
4-metoxibenzoato de octila (**6a**): óleo incolor. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-18); 1,24-1,51 (m, 10H, H-13/14/15/16/17); 1,69-1,84 (m, 2H, H-12); 3,88 (s, 3H, H-8); 4,3 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H-11); 6,88-6,99 (m, 2H, H-2/6); 7,94-8,11 (m, 2H, H-3/5) (Apêndice 41). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 14,1 (C-18); 22,7 (C-17); 26,1 (C-13); 28,8 (C-12); 29,2 (C-14); 29,3 (C-15); 31,8 (C-16); 55,4 (C-8); 64,9 (C-11); 113,6 (C-2/6); 123,0 (C-4); 131,5 (C-3/5); 163,2 (C-1); 166,5 (C-9) (Apêndice 42). CG/ LRMS (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 16,60 min; 264 $[\text{M}]^+$ (9), 153 (20), 152 (100), 135 (50), 107 (8), 77 (10) (Apêndice 43).



Benzoato de octila (**6b**): óleo incolor. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-16); 1,20-1,50 (m, 10H, H-11/12/13/14/15); 1,67-1,86 (m, 2H, H-10), 4,32 (t, J = 6,7 Hz, 2H, H-9); 7,35-7,49 (m, 2H, H-3/5); 7,50-7,63 (m, 1H, H-4); 7,95-8,13 (d, J = 7,2 Hz, 2H, H-2/6) (Apêndice 44). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 14,1 (C-16); 22,7 (C-15); 26,1 (C-11); 28,7 (C-10); 29,2 (C-12); 29,3 (C-13); 31,8 (C-14); 65,2 (C-9); 128,3 (C-3/5); 129,5 (C-2/6); 130,6 (C-1); 132,8 (C-4); 166,7 (C-7) (Apêndice 45). CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 13,56 min; 234 $[\text{M}]^+$ (2), 123 (100), 105 (80), 84 (15), 77 (37), 55 (15), 41 (10) (Apêndice 46).



3,4-diidroxibenzoato de octila (6c): sólido branco. Faixa de fusão 94-96 °C. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-18); 1,18-1,49 (m, 10H, H-13/14/15/16/17); 1,64-1,84 (m, 2H, H-12); 4,28 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H-11); 5,68-6,51 (sl. 2H, H-7/8); 6,91 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H-3); 7,57 (dd, J = 8,3, 1,7 Hz, 1H, H-2); 7,67 (d, J = 1,7 Hz, 1H, H-6) (Apêndice 47). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 14,1 (C-18); 22,7 (C-17); 25,9 (C-13); 28,7 (C-12); 29,2 (C-14); 29,3 (C-15); 31,8 (C-16); 65,4 (C-11); 114,81 (C-3); 116,67 (C-6); 122,7 (C-1); 123,7 (C-2); 143,2 (C-5); 148,9 (C-4); 167,2 (C-9) (Apêndice 48).



4-hidroxi-3-metoxibenzoato de octila (6d): óleo marrom. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-19); 1,21-1,54 (m, 10H, H-14/15/16/17/18); 1,70-1,83 (m, 2H, H-13); 3,97 (s, 3H, H-9); 4,31 (t, J = 6,7 Hz, 2H, H-12); 5,88-6,30 (sl. 1H, H-7); 6,96 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H-3); 7,58 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-6); 7,66 (dd, J = 8,3, 1,7 Hz, 1H, H-2) (Apêndice 49). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 14,1 (C-19); 22,7 (C-18); 26,1 (C-14); 28,8 (C-13); 29,2 (C-15); 29,3 (C-16); 31,8 (C-17); 56,1 (C-9); 65,0 (C-12); 111,7 (C-6); 114,0 (C-3); 122,7 (C-1); 124,1 (C-2); 146,1 (C-4); 149,9 (C-5); 166,5 (C-10) (Apêndice 50). CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 17,91 min; 280 $[\text{M}]^+$ (17), 169 (15), 168 (100), 151 (30), 123 (10), 41 (5) (Apêndice 51).

5.2. Atividade Antiparasitária e Citotoxicidade

Conforme discussão anterior, produtos naturais têm sido amplamente explorados como alternativas para a descoberta de compostos bioativos, especialmente contra cinetoplastídeos (TEMPONE *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2012; GRECCO *et al.*, 2012; VEIGA-SANTOS *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2016). Entretanto, esses compostos frequentemente apresentam estruturas bastante complexas, que inviabiliza sua futura aplicação como fármaco *per se*. Considerando esse paradigma, os fenilpropanóides (como os gibilimbóis) chamam a atenção pela sua promissora atividade biológica, associada a uma simplicidade estrutural única. A simplicidade permite a exploração mais radical da estrutura, e assim, a funcionalização da estrutura protótipo pode ser considerada uma estratégia promissora para a otimização da atividade biológica.

Em trabalho anterior do nosso grupo (VARELA *et al.*, 2016), foram sintetizados e avaliados alguns análogos dos gibilimbóis a partir da observação que a presença da insaturação mais próxima ao anel aromático (gibilimbol B) favorecia a atividade, uma vez que seu isômero constitucional, gibilimbol A, que apresenta a instauração mais distante do anel, é menos ativo. Assim, os análogos propostos foram funcionalizados na cadeia lateral para avaliar possíveis pontos de interação adicionais, e incrementar as propriedades *drug-like* dos protótipos (como por exemplo, a solubilidade em água e a farmacocinética) (GIMÉNEZ *et al.*, 2010).

Os primeiros análogos mantinham a característica fenólica dos protótipos naturais e mantendo o comprimento da cadeia lateral (VARELA *et al.*, 2016). Dentre os compostos apresentados, o LINS03003 (figura 9) foi o que forneceu melhor atividade tanto para a forma tripomastigota (17 μM) quanto amastigota (5,5 μM) de *T. cruzi*. Por outro lado, apresentou também citotoxicidade relativamente elevada (23 μM) em

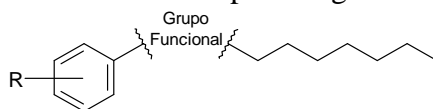
relação aos protótipos. Considerando que os compostos testados foram consideravelmente mais citotóxicos, pode-se associar esse achado com a presença da hidroxila fenólica na estrutura, muitas vezes responsável pela toxicidade de diversos compostos conhecidos. Esse grupo pode formar radicais fenoxila ou sofrer reações de oxidação, gerando metabólitos tóxicos (KAGAN, TYURINA, 1998). Além disso, esse grupo pode também ser associado à classificação de moléculas como PAINS (*Pan-Assay Interference Compounds*) devido à possível atividade redox (SHADNIA, WRIGHT, 2008; BAELL, WALTERS, 2014).

Dando continuidade a esse projeto, o presente trabalho visou explorar novos análogos com modificações na região aromática das moléculas, inicialmente o substituinte na posição 4 do anel aromático, para verificar o papel da hidroxila na atividade e posteriormente a adição de uma hidroxila adicional na posição 3 do anel.

Os compostos que apresentaram grau de pureza acima de 95% (CG) foram enviados para a realização dos ensaios de atividade biológica, avaliada nas formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi* e em células mamíferas da linhagem NCTC clone 929. Os análogos mais promissores também foram avaliados quanto a sua capacidade de perturbar a estabilidade e fluidez da membrana celular.

Segundo algumas diretrizes para o desenvolvimento de fármacos com atividade anti-tripanosoma (KATSUNO *et al.*, 2015), introduzidas pela *Global Health Innovative Technology* (GHIT) *Fund* e pelo *Drugs for Neglected Diseases Initiative* (DNDi), bons protótipos devem ser ativos tanto contra a forma replicante quanto contra a forma infectante do parasita (amastigota e tripomastigota, respectivamente). Isso porque compostos que atuam apenas contra a forma replicante permitem que uma carga parasitária tripomastigota fique no organismo e propague a infecção mesmo depois do tratamento.

Tabela 10: Atividade antiparasitária dos protótipos (gibilimbol A, gibilimbol B e IV), derivados sintéticos **1-6**, contra as formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*.



Composto	R	Grupo Funcional	CE ₅₀ µM (95% IC)		CC ₅₀ µM (95% IC)	Índice de Seletividade	
			TCT	TCA		TCT	TCA
LINS03006	4-OH		NA	NA	99,2	-	-
1a	4-OMe		NA	NA	>200	-	-
1b	4-H		NA	50,0	>200	-	>4,0
LINS03003	4-OH		17,0	5,5	23,5	1,4	4,3
2a	4-OMe		4,2	1,33	31,9	7,6	24,0
2b	4-H		20,7	13,3	73,5	3,6	5,5
2c	3,4-OH		4,8	NA	9,9	2,1	-
2d	3-OMe, 4-OH		16,4	NA	53,0	3,2	-
2e	3,4-OMe		12,2	NA	21,7	1,8	-
LINS03001	4-OH		11,8	22,5	82,8	7,0	3,7
3a	4-OMe		NA	26,2	>200	-	>7,7
3b	4-H		16,5	NA	>200	>12,1	-
LINS03002	4-OH		6,1	NA	49,5	8,1	-
4a	4-OMe		9,4	NA	>200	>21,3	-
4b	4-H		9,8	5,8	>200	>20,4	>34,5
LINS03005	4-OH		26,5	NA	45,5	1,7	-
5a	4-OMe		11,4	5,2	91,5	8,0	17,6
5b	4-H		NA	NA	>200	-	-
LINS03004	4-OH		4,5	NA	130,3	29,0	-
6a	4-OMe		27,1	20,1	>200	>7,4	>9,9
6b	4-H		47,4	35,8	>200	2,6	3,5
6c	3,4-OH		5,3	13,9	107,7	20,3	7,8
6d	3-OMe, 4-OH		4,4	6,8	123,6	28,1	18,2
gibilimbol A ^[a]	4-OH		102,5	NA	224,6	2,2	-
gibilimbol B ^[a]	4-OH	Alceno	75,3	NA	254,1	3,4	-
IV ^[b]	3,4-MeO ₂		67,3	32,6	>200	>2,9	>6,1
benznidazol	-	-	440,7	230,3	269,9	0,6	1,7

CE₅₀: concentração efetiva de 50%; CC₅₀: concentração citotóxica de 50%; NA: Não ativo (CE₅₀>100 µM);

^a: disponível em Varela *et al.* (2016); ^b: 5-[(3*E*)-oct-3-en-1-il]-1,3-benzodioxol; disponível em Varela *et al.* (2017).

A tabela 10 mostra o resultado dos ensaios biológicos e assim como foi observado no primeiro estudo com os compostos LINS03001 a **08** (tabela 1), as aminas foram os análogos mais ativos, principalmente contra a forma tripomastigota, contra a qual todos os análogos apresentaram CE_{50} inferior a 20 μM . Ainda dentre as aminas, o composto **2a**, é o mais ativo para ambas as formas do parasita, com CE_{50} 4,2 μM e 1,33 μM , respectivamente para tripomastigota e amastigota. Além disso, esse análogo é bastante seletivo para as células parasitárias, principalmente em comparação com a forma amastigota, gerando índice de seletividade de 24 vezes para a atividade antiparasitária.

Entretanto, nota-se que a adição de outro substituinte na posição *meta* do anel aromático nos compostos contendo o grupo amino parece anular a atividade contra a forma amastigota, porém mantendo a atividade anti-tripomastigota comparável à dos demais análogos. Por exemplo, os compostos dissustituídos **2c**, **2d** e **2e** foram inativos na forma amastigota, mas mantiveram atividade contra a forma extracelular. A citotoxicidade também foi afetada negativamente com essa adição, o que sugere esses análogos dissustituídos a serem bem menos seletivos que os monossustituídos.

O composto que apresentou o melhor perfil de atividade/seletividade dentre todos os análogos testados foi o composto **4b** com CE_{50} 9,8 μM contra a forma tripomastigota e 5,8 μM contra a forma amastigota. A CC_{50} desse análogo é maior que 200 μM , o que garante a eles uma alta seletividade entre as células parasitárias e mamíferas (IS: >20 contra tripomastigota e >34 contra amastigota). O DNDi recomenda que a potência mínima para um composto ser considerado promissor é de 10 μM contra a forma intracelular (KATSUNO *et al.*, 2015) e que haja pelo menos uma diferença de 10 vezes entre a CC_{50} e CE_{50} . Considerando esse parâmetro, o composto **4b**, seria um dos análogos mais promissores da série para ambas as formas do parasita. Os análogos

LINS03002 e **4a** são ativos apenas contra a forma tripomastigota do parasita e, no caso do análogo fenólico, a CC_{50} é de 49,5 μ M, 4 vezes mais tóxico.

O composto carbonílico α,β -insaturado **3a** apresentou um valor de CE_{50} de 26 μ M contra a forma amastigota, valor comparável ao seu análogo fenólico LINS03001 (CE_{50} 23 μ M), porém com um índice de seletividade maior ($>7,7$) devido à baixa citotoxicidade para células mamíferas ($CC_{50}>200$ μ M). Já o análogo **3b** não foi ativo contra a forma amastigota, mas apresentou uma atividade de 16,5 μ M contra a forma tripomastigota, comparável ao análogo LINS03001 (CE_{50} 12 μ M). Mais uma vez, a substituição da hidroxila fenólica reduziu a citotoxicidade deste análogo, levando à uma seletividade 12 vezes maior pelas células parasitárias.

É importante ressaltar que no caso de atividade contra agentes infecciosos, além da potência, a avaliação do índice de seletividade entre a atividade nas células parasitárias e nas mamíferas é imprescindível. Considerando esse fato, apesar de o composto **2a** ser o mais potente da série, os compostos **4b** e **6d** são considerados mais promissores, principalmente em relação à atividade contra a forma replicativa. Os três análogos são ativos contra a forma infectiva, com destaque para **4b** e **6d** que são apresentam maior seletividade (>20 vezes) contra essa forma, interessante para a fase aguda quando essa forma predomina no organismo.

Os derivados de ácido carboxílico também apresentaram atividades promissoras e diferentemente das aminas secundárias, a adição de um substituinte na posição *metano* anel aromático elevou a atividade e a seletividade dos ésteres. Os análogos **6c** e **6d** foram os mais ativos, com CE_{50} de 13,9 μ M e 6,8 μ M e índice de seletividade de 7,8 e 18,2, respectivamente, considerando a forma amastigota do parasita. Somado a isso, ambos os compostos foram ativos contra a forma infectiva do parasita (CE_{50} de 5,3 μ M e 4,4 μ M, respectivamente). Entretanto, a citotoxicidade desses compostos é maior que

dos análogos **6a** ou **6b** e semelhante à do análogo LINS03004, possivelmente devido à presença da hidroxila fenólica.

Comparando os bioisósteros **5a**(uma amida) e **6a**(um éster), observa-se que a amida é mais ativa contra ambas as formas do parasita, especialmente contra a forma amastigota (CE₅₀ de 5,2 µM e 20,1 µM, respectivamente), mas também é mais citotóxica, com CC₅₀ 91,5 µM. O análogo éster não é tóxico até a concentração máxima testada. Entretanto, a amida é razoavelmente seletiva tanto para tripomastigotas (8,0) quanto para amastigotas (17,6) sendo uma opção mais atrativa que o éster cuja potencia é superior a 20 µM contra ambas as formas.

Considerando os resultados obtidos com os diferentes substituintes no anel, de forma geral, os dados sugerem que os análogos testados podem ter mecanismos de ação diferentes, já que o mesmo padrão de substituição no anel leva a grandes diferenças na atividade de alguns análogos, e talvez possam ser classificados em dois grupos distintos. Para as aminas, a adição de um segundo substituinte na posição *meta* do anel aromático anula a atividade contra a forma amastigota. Entretanto, para os compostos derivados de ácido carboxílico o comportamento é o oposto, uma vez que há um aumento da atividade em ambas as formas. Além disso, os compostos amínicos apresentam em geral maior citotoxicidade que os outros derivados. Já os derivados ésteres e amidas são bem menos citotóxicos, garantindo aos compostos boa seletividade.

5.3. Avaliação da Alteração da Permeabilidade da Membrana Celular

O trabalho publicado pelo grupo de Oliveira (2012) mostrou, além da atividade promissora do gibilimbol B contra tripomastigotas de *T. cruzi*, que esse mesmo alquilfenol apresenta uma atividade perturbadora da membrana celular contra promastigotas de *L. infantum* (figura 37). Foi hipotetizado que essa atividade poderia estar correlacionada com o fato de a estrutura do gibilimbol B se assemelhar à do ergosterol, ou seja, apresentando uma cabeça polar (hidroxila fenólica) e cauda apolar (cadeia lateral insaturada).

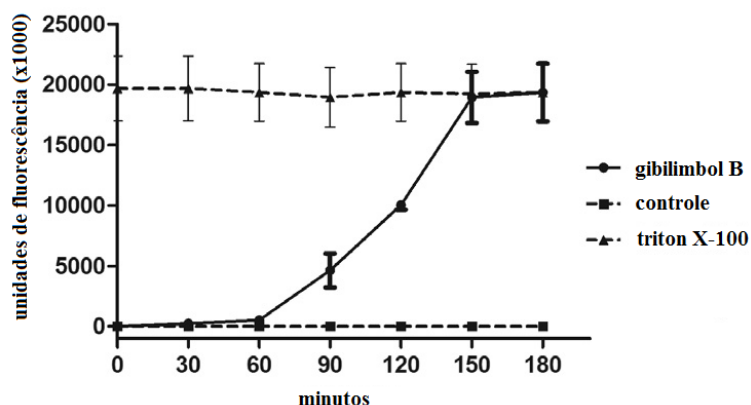


Figura 37: Atividade perturbadora de membrana do gibilimbol B, realizado em promastigotas de *L. infantum*. Triton X-100 é controle positivo e células não tratadas são o controle negativo. Adaptado de Oliveira *et al.* (2012).

O ensaio é realizado utilizando uma sonda fluorescente chamada SYTOX® Green, um corante de ácidos nucleicos que não é capaz de permear a membrana celular em condições normais, porém quando interage com ácidos nucleicos há um aumento 500 vezes na fluorescência observada. Quando há algum tipo de perturbação na estrutura da membrana, o corante é capaz de entrar na célula, sendo útil para determinar se determinado composto adicionado ao meio é capaz de causar tal efeito na célula (GAFORIO *et al.*, 2002). Como prova de conceito do ensaio, é utilizado como controle positivo um surfactante, o Triton X-100, que é capaz de desestabilizar a membrana celular.

Com o intuito de verificar se os novos compostos apresentam a mesma capacidade, os análogos mais promissores foram submetidos mesmo ensaio. O composto **2b** foi testado contra a forma promastigota de *L. infantum*, nas concentrações de CE₅₀ e CE₉₀ e o tempo foi avaliado a cada 30 minutos por 3 horas.

Observando a figura 38, é possível notar que **2b** não apresenta atividade perturbadora de membrana na menor concentração testada e que, na concentração de CE₉₀, ele causou um aumento de aproximadamente 20% na fluorescência em comparação do surfactante Triton X-100. Ao final desse tempo, o controle positivo é adicionado ao meio, causando um aumento na fluorescência, de forma a comprovar a veracidade do teste.

Esse análogo não apresenta uma hidroxila no anel aromático, o que dava a característica de “cabeça” polar ao gibilimbol B. Assim, é plausível dizer que a ausência da hidroxila na estrutura desse composto pode ser responsável pela perda da atividade perturbadora de membrana, uma vez que ela não seria capaz de se inserir facilmente na membrana celular.

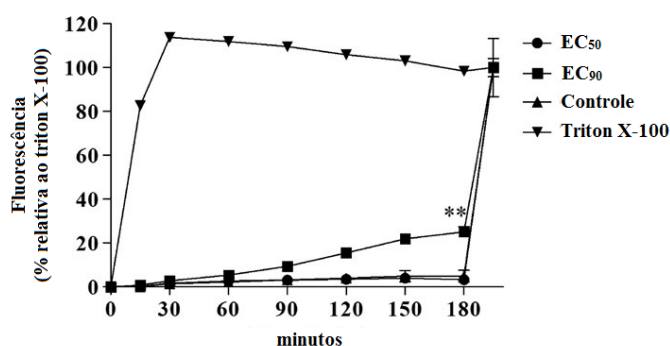


Figura 38: Ensaio com SYTOX Green do composto **2b** realizado em promastigotas de *L. infantum* em sua CE₅₀ e CE₉₀, no intervalo de 0 a 180 minutos. Adaptado de Varela *et al.* (2017).

Para avaliar se o papel de outros substituintes no anel poderia ser semelhante ao da hidroxila fenólica, os compostos **2a**, **5a**, **6a**, **6b** e **6d** (figura 39) foram também testados contra a forma tripomastigota de *T. cruzi*, avaliados nas respectivas concentrações de CE₅₀ a cada 10 minutos no período de 1 hora. Desta vez, os análogos

foram testados na forma infectiva de *T. cruzi* e por até 1 hora. Esse ensaio mostrou que o composto **2a** causou certa alteração na membrana celular levando, ao final do ensaio, a um aumento de 21% na fluorescência observada. O éster **6d** foi o segundo que mais elevou a fluorescência, atingindo 11% em comparação com o controle. Apesar disso, ambos os compostos são mais de 20 vezes mais seletivos para a célula parasitária em relação à mamífera.

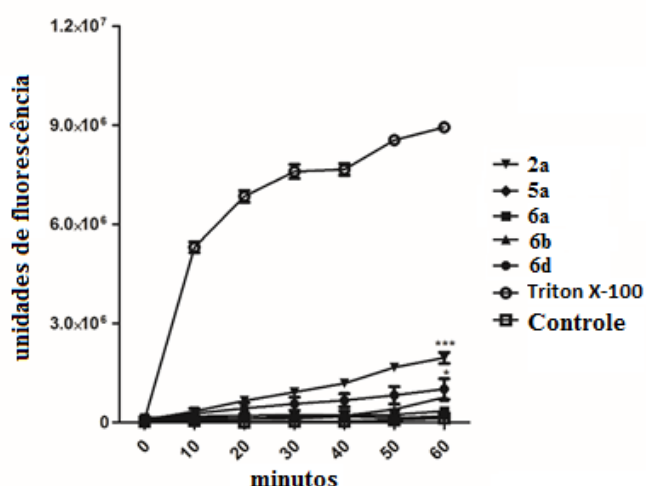


Figura 39: Ensaio com SYTOX Green dos compostos, **2a**, **5a**, **6a**, **6b** e **6d** realizado em tripomastigotas de *T. cruzi*, no intervalo de uma hora.

Os resultados sugerem que os análogos LINS03 não perturbam a membrana de maneira significativa. Apesar do composto **2a** ter promovido um pequeno aumento na permeabilidade da membrana à sonda fluorescente, essa atividade não se compara à que foi promovida pelo produto natural gibilimbol B. Além disso, os demais compostos não causaram aumento significativo na permeabilidade, sugerindo que o mecanismo de ação antiparasitária não está diretamente ligado à capacidade perturbadora da membrana celular. O fato de alguns dos compostos terem apresentado atividade antiparasitária com CC_{50} bastante alta reforça esta hipótese. Espera-se que a atividade permeabilizante da membrana esteja também relacionada à citotoxicidade e baixa seletividade, já que células mamíferas também apresentam membrana celular e consequentemente poderiam ser afetadas por essa atividade.

5.4. Estudos de Relação Estrutura-Atividade

Uma das etapas do desenvolvimento de fármacos é a descoberta de moléculas *hits* e *leads*, ou seja, moléculas que apresentem uma atividade biológica desejada, mas que ainda precisem ter certas características melhoradas. Quando um composto líder (*lead*) ou protótipo é escolhido, diversas modificações são propostas racionalmente, visando melhorar suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (PATRICK, 2013).

A GE é uma medida farmacométrica que pode ser utilizada para determinar o quanto a adição de átomos pesados (HA – *heavy atoms*, ou não-hidrogênio) é realmente significativa no aumento da atividade biológica (VERDONK, REES, 2008). Derivada do conceito de eficiência de ligantes (HOPKINS *et al.*, 2004), essa abordagem permite que seja feita uma correlação entre a variação de átomos pesados entre uma molécula parental e derivados substituídos. Para tanto, o cálculo das GE nas moléculas foi feito considerando apenas o substituinte na posição *para* do anel aromático e tomando como molécula parental os análogos com apenas hidrogênios ligados no anel. Já as moléculas que apresentam dois substituintes, a molécula parental escolhida foi aquela que apresentava o mesmo substituinte na posição *para*. Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 11.

Tabela 11: Eficiência de grupos calculada entre os análogos com mesmo grupo funcional e diferentes padrões de substituição no anel aromático. Os valores apresentados referem-se aos substituintes destacados em negrito na tabela.

Grupo Funcional	Composto	R1	R2	Eficiência de Grupo (GE)		
				TCT	TCA	NCTC
Amina	2b	H	H	-	-	-
	LINS03003	OH	H	0,1172	0,53	0,68
	2a	OMe	H	0,4745	0,69	0,25
	2c	OH	OH	0,7524	>-1,7	0,51
	2d	OH	OMe	0,0107	>-0,9	-0,2
	2e	OMe	OMe	-0,317	>-1,3	0,11
Cetona α,β -insaturada	3b	H	H	-	-	-
	LINS03001	OH	H	0,1995	0,89	0,53
	3a	OMe	H	ND	0,4	ND
Álcool α,β -insaturado	4b	H	H	-	-	-
	LINS03002	OH	H	0,2821	>-1,7	0,83
	4a	OMe	H	0,0124	>-0,8	ND
Amida	5b	H	H	-	-	-
	LINS03005	OH	H	0,7902	ND	0,88
	5a	OMe	H	0,646	0,88	0,55
Éster	6b	H	H	-	-	-
	LINS03004	OH	H	1,4009	ND	ND
	6a	OMe	H	0,1663	0,17	ND
	6c	OH	OH	-0,097	ND	ND
	6d	OH	OMe	0,0067	ND	ND

ND: não determinado.

A análise dos dados obtidos pelo cálculo da eficiência de grupos depende do peso molecular dos compostos avaliados. Assim, considerando moléculas de até 300 Da, para manter uma eficiência de grupo de 0,52 (ou mais) a adição de um átomo pesado deve levar à um aumento de pelo menos 2,3 vezes na atividade biológica. No caso de quando dois átomos pesados são adicionados, a potência deve ser elevada pelo menos em 5,5 vezes, e assim por diante (VERDONK, REES, 2008; HOPKINS *et al.*, 2014). Em outras palavras, em moléculas pequenas, um valor de GE menor que 0,52 para a adição de um grupo indica que este não contribui significativamente para a atividade biológica.

Em geral, a adição de grupos hidroxila ou metoxila na posição *para* do anel parece contribuir positivamente na atividade anti-amastigota. Considerando as aminas secundárias monossustituídas, a adição da hidroxila (um átomo pesado) produziu uma GE de 0,53, e assim considera-se que o grupo hidroxila é eficiente em aumentar a atividade da molécula. Já para o análogo metoxilado **2a** (dois átomos pesados), o aumento na potência é de 10 vezes, que produz um valor de GE de 0,69. Assim, a metoxila é considerada mais eficiente que a hidroxila no aumento da atividade anti-amastigota. Já no caso das aminas dissustituídas (**2c-2e**), o único análogo que apresenta uma melhora na atividade biológica é o composto **2c**, e apenas contra a forma tripomastigota. Para a forma amastigota, a adição de qualquer substituinte na posição *meta* prejudicou a atividade (valores de GE negativos). A GE nesse caso foi calculada em relação ao análogo LINS03003, gerou um valor de GE = 0,75 para a adição do grupo hidroxila na posição *meta*. Assim, a análise de GE sugere que, em geral, a adição de substituintes *meta*-orientados é prejudicial para a atividade antiparasitária.

Comportamento semelhante é observado no caso das amidas (**5**). É possível observar que a adição da metoxila na posição *para* do anel aromático contribui significativamente para a atividade, uma vez que o análogo parental **5b** foi inativo (CE₅₀ >100 µM) contra ambas as formas do parasita. A adição do grupo foi considerada eficiente (GE = 0,646 contra a forma tripomastigota e GE = 0,88 contra a forma amastigota), correspondendo a um aumento na atividade de pelo menos 8,7 e 19,2 vezes, respectivamente. Em contrapartida, nos compostos α,β -insaturados (**3** e **4**), a adição da hidroxila ou metoxila não foi eficiente em potencializar a atividade. Exceção deve ser feita para o composto **3a**, em que a adição da hidroxila aumentou consideravelmente a atividade anti-amastigota (GE = 0,89).

Com relação à citotoxicidade, observa-se que a adição da hidroxila aumenta consideravelmente a citotoxicidade dos compostos e consequentemente prejudica a seletividade de ação, especialmente quando inserida na posição *para* do anel. A introdução da hidroxila produziu um valor de GE de no mínimo 0,53 (LINS03001), indicando aumento significativo na citotoxicidade. Em alguns casos, como no composto LINS03005, a hidroxila produziu valor de GE de 0,88. Mesmo sua introdução na posição *meta* do anel parece aumentar significativamente a citotoxicidade. Por exemplo, sua presença na estrutura do composto **2c** gera um valor de GE de 0,51 na citotoxicidade observada.

Por outro lado, a adição do grupo metoxila parece ter uma contribuição muito mais favorável à menor citotoxicidade. O maior valor de GE encontrado para a contribuição desse grupo na toxicidade foi para a amida **5a** (GE = 0,55), sendo este o único caso em que esse grupo contribuiu de maneira importante para a citotoxicidade. Entretanto, esse análogo ainda é bastante seletivo, principalmente se comparado com o análogo hidroxilado, LINS03005, que é pelo menos 4 vezes mais tóxico que a molécula parental e muito pouco seletivo. Como a citotoxicidade é uma atividade indesejada, conclui-se que a adição da metoxila tem um impacto menor na citotoxicidade do que a adição da hidroxila, e, portanto é considerado o melhor substituinte nessa posição do anel.

Além do estudo de eficiências de grupo, foram calculados uma série de descritores moleculares a fim de buscar características que pudessem influenciar nos resultados observados. Dentre esses descritores, estão os que se encontram como parâmetros da regra dos cinco de Lipinski (LIPINSKI *et al*, 2001) um filtro muito utilizado pela indústria farmacêutica no processo de descoberta de fármacos, especialmente quando este é feito através da técnica de *high throughput screening*

(HTS). A regra é uma forma muito utilizada de avaliar se determinadas moléculas apresentariam boa biodisponibilidade oral com base na sua lipofilicidade, hidrofiliicidade e solubilidade. Essas características são comumente conhecidas como *drug likeness*.

Para que um composto seja considerado promissor pela regra dos cinco, ele não pode violar mais de uma das quatro regras, que são: até 5 HBD, até 10 HBA, massa molecular de até 500 Da, e $\log P$ menor do que 5. Esses descritores estão descritos na tabela 12. Todos os compostos planejados neste trabalho passam pelo filtro, sendo que violam apenas um dos critérios, sugerindo que esses compostos podem apresentar boa biodisponibilidade por via oral. Como as violações cometidas por alguns deles tange ao valor de $\text{ml}\log P$ maior que 5, pode-se também prever que esses compostos são relativamente lipofílicos, o que pode impactar em sua solubilidade em água, sendo essa uma limitação futura para a aplicação dessas moléculas como fármacos. Além disso, foram calculadas outras propriedades moleculares utilizando o software Marvin Sketch 16.1.8.0 (ChemAxon Inc.) nas suas configurações padrão. Os descritores escolhidos para a análise de dados estão dispostos na tabela 12 e incluem valores de volume e superfície molecular de van der Waals, balanço hidrofiliicidade-lipofilicidade, coeficiente de distribuição ($\log D$) em pHs com relevância fisiológica e solubilidade em água ($\log S$).

Tabela 12: Descritores da regra dos cinco de Lipinski e demais descritores moleculares calculadas.

Composto	miLogP	Massa Molecular	HBA	HBD	HLB	logD _{1,5}	logD _{5,0}	logD _{6,0}	logD _{7,4}	logS _{7,4}	Superfície Molecular	Volume
LINS03006	4,75	233,35	2	1	3,34	1,31	1,39	2,19	3,02	-3,26	424,74	248,29
1a	5,29	247,38	2	0	3,43	1,45	1,53	2,29	3,12	-3,3	461,71	265,96
1b	5,23	217,36	1	0	1,72	1,61	1,65	2,23	3,02	-3,02	413,44	239,87
LINS03003	4,48	235,37	2	2	8,75	1,09	1,11	1,53	2,26	-2,11	444,84	255,55
2a	5,01	249,4	2	1	8,82	1,23	1,26	1,64	2,36	-2,04	481,37	273,12
2b	4,96	219,37	1	1	7,14	1,39	1,41	1,75	2,43	-1,93	433,45	247,17
2c	3,99	251,37	3	3	10,30	0,78	0,84	1,53	2,34	-1,99	455,32	264,03
2d	4,29	265,4	3	2	10,31	0,93	0,96	1,44	2,2	-1,96	492,69	281,6
2e	4,6	279,42	3	1	10,25	1,08	1,11	1,58	2,34	-2,19	529,13	299,15
LINS03001	4,81	246,35	2	1	2,53	5,09	5,09	5,08	5,08	-4,71	422,33	255,01
3a	5,35	260,38	2	0	2,60	5,23	5,23	5,23	5,23	-5,13	459,81	272,54
3b	5,29	230,35	1	0	1,57	5,39	5,39	5,39	5,39	-5,32	411,53	246,47
LINS03002	5	248,37	2	2	3,02	4,67	4,67	4,67	4,67	-4,5	432,51	261,32
4a	5,53	262,39	2	1	1,37	4,98	4,98	4,98	4,98	-5,09	421,99	252,81
4b	5,48	232,37	1	1	3,11	4,82	4,82	4,82	4,82	-5,11	470,11	278,84
LINS03005	4,11	249,35	3	2	4,99	3,84	3,85	3,84	3,81	-4,44	439,28	257,09
5a	4,65	263,38	3	1	5,01	3,99	3,99	3,99	3,99	-4,88	475,8	274,67
5b	4,59	233,35	2	1	3,43	4,15	4,15	4,15	4,15	-4,87	428,17	248,62
LINS03004	5,09	250,34	3	1	4,74	4,78	4,78	4,77	4,74	-4,62	437,57	254,54
6a	5,62	264,37	3	0	4,78	4,92	4,92	4,92	4,92	-5,07	474,29	272,17
6b	5,57	234,34	2	0	3,15	5,08	5,08	5,08	5,08	-5,05	425,99	246,17
6c	4,6	266,34	4	2	6,27	4,47	4,47	4,47	4,44	-4,19	448,17	263,1
6d	4,91	280,36	4	1	6,26	4,62	4,62	4,62	4,61	-4,65	485,03	280,58
A	5,87	232,37	1	1	1,37	5,82	5,82	5,82	5,82	-5,76	425,57	252,56
B	5,87	232,37	1	1	1,37	5,82	5,82	5,82	5,82	-5,76	425,89	252,6

Além dos parâmetros que descrevem a regra dos cinco, outros descritores físico-químicos, estruturais e topológicos foram calculados (tabela 12) com o objetivo de avaliar quais características poderiam estar associadas com as diferenças de atividade biológica observadas. Para tanto, foram feitas as análises de PCA e HCA. A utilização dessas técnicas estatísticas de explorar um conjunto grande de variáveis ajuda a buscar padrões que expliquem o resultado de um dado experimento e quais informações são mais relevantes para chegar ao resultado desejado (MOITA NETO, MOITA, 1998).

A PCA é uma forma de avaliar uma grande quantidade de variáveis correlacionadas e dependentes criando novas variáveis que englobem a maior quantidade de informação (variância) e que são ortogonais entre si, ou seja, não descrevem a mesma característica. O número total de variáveis independentes geradas nessas análises é igual ou menor que o número de variáveis inicial. Essas novas variáveis são chamadas de PCs. Essa análise também permite a redução do número de variáveis, uma vez que mostra quais delas não tem grande importância dentro do espaço amostral (CORREIA, FERREIRA, 2007).

Já a HCA gera um dado gráfico conhecido como dendograma em que as amostras são agrupadas com base nas suas similaridades nas variáveis independentes. Essa separação é feita a partir do cálculo das distâncias Euclidianas entre as amostras e são agrupadas de acordo com índices de similaridade. Assim, moléculas agrupadas num mesmo agrupamento ou *cluster* são bastante similares entre si e, conforme aumenta a distância entre as amostras, maiores são as suas diferenças (MOITA NETO, MOITA, 1998).

Dessa forma, as variáveis calculadas e apresentadas na tabela 12 foram utilizadas para a análise exploratória de dados. Para evitar problemas com as diferentes

dimensões de cada descritor, estes foram autoescaladas, ou seja, cada valor foi centrado na média dos valores absolutos e dividido pelo desvio padrão encontrado. Com os dados normalizados, os gráficos de PCA e o dendograma do HCA foram gerados pelo software PAST 3.18 (HAMMER *et al.*, 2001).

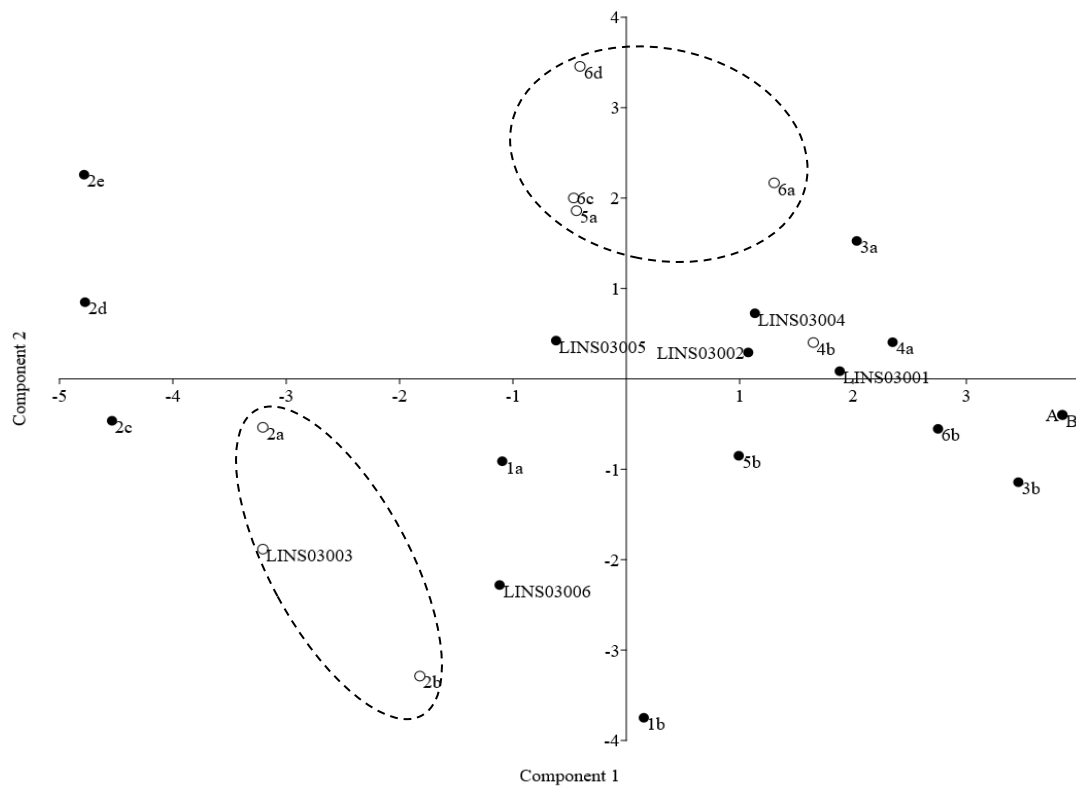


Figura 40: Gráfico da análise de componentes principais com a PC1 no eixo x e PC2 no eixo y.

Tabela 13: Pesos dos descritores na análise de componentes principais.

Descritores	PC1	PC2
miLogP	0,29205	-0,03506
MassaMolecular	-0,12628	0,51989
HBA	-0,17126	0,42149
HBD	-0,19856	0,06096
HLB	-0,35165	0,11383
logD (pH 1.5)	0,34411	0,22811
logD (pH 5.0)	0,34479	0,22713
logD(pH 6.5)	0,35162	0,21292
logD(pH 7,4)	0,35953	0,18458
logS(pH 7.4)	-0,3521	-0,19449
Superfície Molecular	-0,23988	0,36217
Volume Molecular	-0,18612	0,42678

O gráfico apresentado na figura 40 mostra a distribuição das amostras em relação às PCs1 e 2, que representam respectivamente 56,9% e 24,7% da variância. Na tabela 13 estão dispostos os pesos de cada variável dentro dessas duas componentes principais. De forma geral, a PC1 está relacionada a variáveis que descrevem as características de lipofilicidade e hidrossolubilidade dos compostos (miLogP, logD, logS, HLB), enquanto a PC2 é composta principalmente por descritores estéricos e topológicos de cada molécula (massa, volume e superfície molecular).

Para facilitar a análise visual do gráfico da PCA, os compostos que apresentaram $CE_{50} < 20 \mu M$ contra a forma amastigota do parasita foram marcados com o círculo vazio e aqueles que apresentaram $CE_{50} > 20 \mu M$ estão representados pelo círculo cheio.

Considerando a PC1, os compostos mais ativos apresentam valores negativos para esta PC, e estão agrupados do lado esquerdo do gráfico. Essas moléculas apresentam em comum a presença de um nitrogênio básico (aminas e iminas). Os compostos considerados neutros em pHs fisiológicos estão concentrados no lado positivo do mesmo eixo. Verificando a tabela 13, o maior peso nesta PC é dado pelos

descritores lipofílicos. Assim, o resultado sugere que moléculas menos lipofílicas tem valor negativo para a PC1, e consequentemente são mais ativas.

Entretanto, compostos excessivamente hidrofílicos (**2c-e**) parecem inativos contra a forma amastigota do parasita. Como o descritor HLB tem peso considerável na PC1, pode-se inferir que existe um valor ótimo para a lipofilicidade. Por exemplo, o composto **2a** tem HLB igual a 8,82 e é mais ativo que o análogo hidroxilado (HLB = 8,75) e que o análogo não-substituído **2b** (HLB = 7,14). Este último é o mais lipofílico dos três ($\text{milog}P = 5,01$). Já os análogos dissustituídos **2c**, **2d** e **2e** são menos lipofílicos e possuem valores de HLB maior que 10, que indica que uma hidrofilicidade muito alta não é favorável para atividade contra essa forma. Além disso, a provável explicação para a baixa atividade desses compostos é a presença de um substituinte a mais na posição *meta* do anel, que é detrimental para a atividade desses compostos, conforme discutido anteriormente. Esse mesmo fator pode estar associado com a separação entre as aminas monosubstituídas, ativas, e as iminas análogas, inativas. Por exemplo, o composto **2a** tem valor de HLB de 8,82, enquanto que a imina correspondente **1a** tem HLB = 3,43, o que indica que compostos muito lipofílicos também não são muito ativos.

Há uma clara separação entre os compostos ionizáveis (aminas e iminas) e os compostos neutros. Como pode ser observado na tabela 12, os valores de $\log D$ não variam consideravelmente com o pH para os compostos que não apresentam um nitrogênio básico. Considerando a diferença observada nos descritores e no resultado da PCA, pode-se supor que as aminas possam atuar por mecanismo de ação diferente dos análogos neutros.

Considerando a PC2, os análogos mais ativos são aqueles com os valores mais positivos de PC2 o que indica que a atividade é bastante influenciada por fatores estéricos e topológicos. Curiosamente, os derivados de ácido carboxílico são os que apresentam valores maiores para a PC2. Além disso, a avaliação dos pesos dos descritores na PC2 sugere que a presença de mais aceptores de ligação de hidrogênio nesses compostos pode estar associada à melhor atividade. Por exemplo, entre os ésteres **6a** e **6b**, o derivado metoxilado **6a** é mais ativo que o hidrogenado **6b**. Ainda, a adição de outro substituinte no anel aromático, como em **6c** e **6d**, adiciona mais um acceptor de ligação de hidrogênio na molécula e esses análogos são mais ativos que os monossustituídos.

O balanço hidrofílico-lipofílico também tem um peso considerável na PC2 e parece ter um papel relevante na atividade dos compostos neutros. Por exemplo, existem diferenças consideráveis na atividade dos bioisósteros **5a** e **6a**, mesmo sendo estruturalmente muito semelhantes. A amida **5a** apresenta um nitrogênio doador de ligação de hidrogênio que o éster não possui, levando a um HLB maior (5,01) que o éster análogo (4,78), sendo mais ativa. Essa mudança também gera um logS menos negativo (-4,88), indicando que a mesma é mais hidrossolúvel que o éster.

Para complementar as informações obtidas na análise de PCA, o dendograma gerado pela HCA (figura 41) mostra a separação das amostras em dois grupos principais. A separação foi feita através do método de Ward e utilizando o índice de similaridade Euclidiano (WARD, 1963).

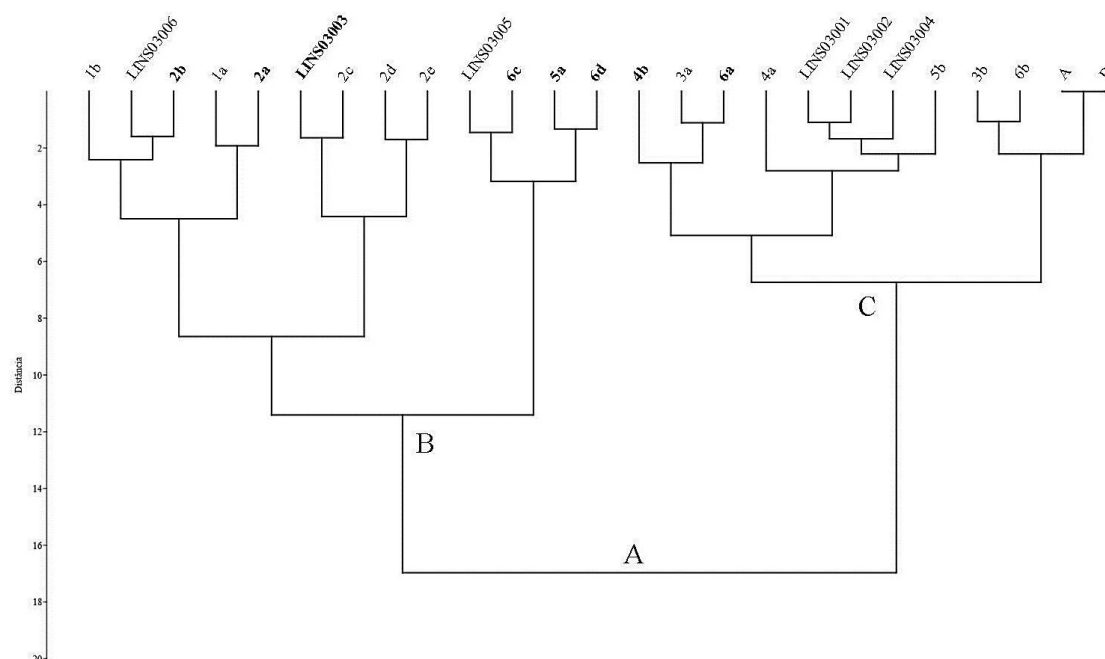


Figura 41: Análise de agrupamento hierárquico (HCA) representando a separação dos análogos em dois grupos principais. Os compostos destacados em negrito são os mais ativos ($CE_{50} < 20 \mu M$).

Todo o conjunto da série **A** (figura 41) está dividido em dois grupos principais. Nota-se que os análogos que apresentaram valores negativos de PC1 estão agrupados no *cluster B*, contendo os derivados ativos **LINS03003**, **2a** e **2b**, **5a** e **6c** e **6d**; o *cluster C* contém os demais análogos neutros, com valores de PC1 positivos, incluindo os compostos **4b** e **6a**. Ainda, dentro do *cluster B* observa-se a separação dos análogos básicos, aminas e iminas, e os compostos carboxílicos. Como alguns compostos não-básicos como os ésteres **6c** e **6d** e a amida **5a** estarem agrupados juntamente com os análogos básicos, pode-se inferir que o *cluster B* é compreendido por moléculas mais hidrofílicas, e estas tendem a ser mais ativas, conforme discutido anteriormente. Além disso, há uma distância grande separando as aminas e iminas desses compostos (em torno de 12).

O *cluster C* é compreendido pelas moléculas mais lipofílicas e divide-se em três grupos, sendo que há um agrupamento dos análogos ativos **6a** e **4b**, juntamente com o

composto **3a** que, apesar de não estar destacado, é ativo com CE₅₀ de 26,2 µM contra a forma amastigota. Ainda, esses análogos não apresentam toxicidade para as células mamíferas até 200 µM. Assim, o resultado sugere que o *cluster C* apresenta os compostos com menor citotoxicidade.

De forma geral, a análise de PCA e HCA permite inferir que há uma separação entre os compostos básicos e compostos neutros, indicando que a capacidade de ionização leva a um mecanismo de ação completamente diferente do exercido pelos compostos neutros. Nota-se que o balanço entre a lipofilicidade e a hidrossolubilidade dos compostos está diretamente ligado com a atividade, uma vez que os análogos com valores extremos dessas variáveis tendem a ser inativos. Ainda, a presença da metoxila é um fator que está associado tanto a um aumento de atividade quanto na seletividade dos compostos mais ativos, neutros ou básicos, quando comparados com os seus análogos fenólicos ou hidrogenados.

CONCLUSÕES

Após os procedimentos experimentais e a análise dos resultados, pode-se concluir que os compostos propostos neste trabalho foram obtidos com rendimentos bons a excelentes sem grandes dificuldades sintéticas, salvos os compostos **3c** e **4c** que não foram obtidos em quantidade suficiente após a purificação para serem adequadamente caracterizados. Os ensaios de atividade biológica mostraram que as modificações propostas levaram a um aumento na potência e seletividade dos compostos em relação aos produtos naturais, sendo que os compostos básicos dissubstituídos foram menos ativos, enquanto que os análogos neutros com esse padrão de substituição foram mais ativos. Considerando os substituintes do anel aromático, a metoxila parece influenciar de forma mais positiva tanto a atividade antiparasitária quanto a seletividade dos compostos.

Os ensaios de permeabilidade de membrana indicam que esses análogos, diferentemente do gibilimol B, não apresentam capacidade de alterar a permeabilidade de forma significativa, indicando que apresentam outro mecanismo de ação. Ainda, as diferenças observadas entre o comportamento dos compostos básicos e neutros pode sugerir que haja mais de um mecanismo de ação possível para os análogos da série LINS03, que deverão ser estudados mais a fundo.

Finalmente, os resultados permitem concluir algumas REA para os compostos desta série, que estão sumarizadas nas figuras 42 e 43. Como dentro da série os compostos se dividem em neutros e básicos e as modificações levam a resultados distintos de atividade biológica, os estudos de relação estrutura-atividade foram separados.

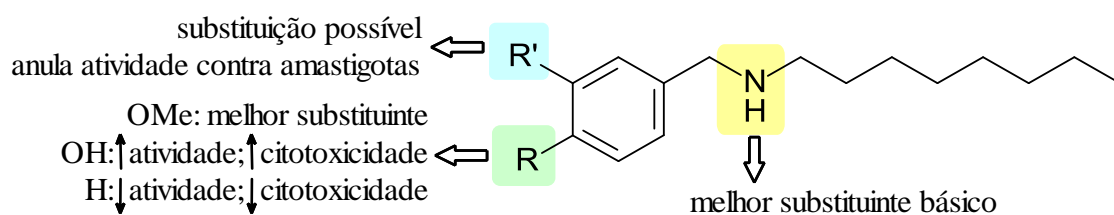


Figura 42: Relação estrutura-atividade proposta para os derivados amina.

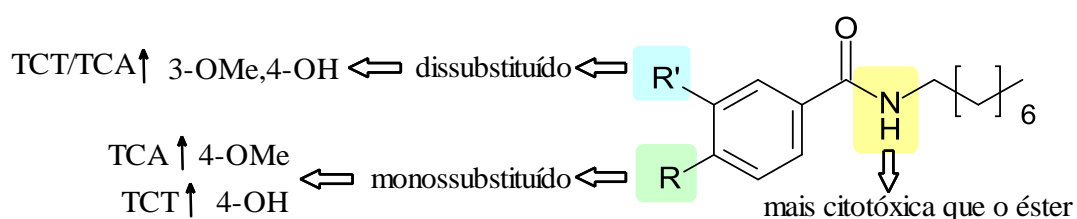


Figura 43: Relação estrutura-atividade proposta para os derivados de ácido carboxílico.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste projeto permitiram a determinação de quais modificações são mais promissoras e quais devem ser evitadas guiando, assim, a continuação do trabalho. Futuramente, pretende-se planejar uma nova série de compostos mantendo os grupos funcionais mais promissores e testando novos padrões de substituição no anel aromático. Além disso, os resultados mostram que o balanço entre a lipofilicidade e a hidrossolubilidade é suma importância para que os análogos sejam ou não ativos assim, novos análogos a serem propostos devem levar esse parâmetro em consideração de forma a melhorar a solubilidade em água, mantendo a lipofilicidade adequada para alta atividade antiparasitária e baixa citotoxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MAGID, A. F., CARSON, K.G., HARRIS, B.D., MARYANOFF, C.A., SHAH, R.D. Reductive amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride. Studies on direct and indirect reductive amination procedures. **J. Org. Chem.** v. 61. p. 3849-3862. Mai/1996.
- ABDI, H., WILLIAMS, L. J. Principal component analysis. **WIREs Comp. Stat.**, v. 2, p. 433-459, 2010.
- ADADE, C. M, CARVALHO, A. L. O., TOMAZ, M. A., COSTA, T. F. R., GODINHO, J. L., MELO, P. A., LIMA, A. P. C. A., RODRIGUES, J. C. F., ZINGALI, R. B., SOUTO-PADRÓN, T. Crovirin, a Snake Venom Cysteine-Rich Secretory Protein (CRISP) with Promising Activity against Trypanosomes and *Leishmania*. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 8, 10. e. 3252. Out/2014.
- ALMEIDA, B. C., ARAÚJO, B. Q., CARVALHO, A. A., FREITAS, S. D., MACIEL, D. D. FERREIRA, A. J., TEMPONE, A. G., MARTINS, L. F., ALEXANDRE, T. R., CHAVES, M. H., LAGO, J. H. Antiprotozoal activity of extracts and isolated triterpenoids of 'carnauba' (*Copernicia prunifera*) wax from Brazil. **Pharm. Bio.** v. 54. p. 3280-3284. Ago/2016.
- AUFDERHEIDE, A. C., SALO, W., MADDEN, M., STREITZ, J., BUIKSTRA, J., GUHL, F., ARRIAZA, B., RENIER, C., WITTMERS, L. E. Jr, FORNACIARI, G., ALLISON, M. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 101, 7. p. 2034-2039. Fev/2003.
- BAELL, J., WALTERS, M. A. Chemical Con Artists Foil Drug Discovery. **Nature**. v. 513. p. 481-483. Set/2014.
- BALBINO, E. E., DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Braz. J. Pharmacog.** v.20. p. 992-1000. Out/2010.
- BANDGAR, B. P., KASTURE, S. P., KAMBLE, V. T. Chemoselective acetylation of alcohols, amines, and thiols without catalyst and solvent. **Synth. Commun.**, v. 31(15), p. 2255-2259, 2006.
- BANGERT, M., MOLYNEUX, D. H., LINDSAY, S. W., FITZPATRICK, C., ENGELS, D. The cross-cutting contribution of the end of neglected tropical diseases to the sustainable development goals. **Infect. Dis. Poverty**. v.6. 2017.
- BATISTA, J. M., BATISTA, A. N., RINALDO, D., VILEGAS, W., ANBRÓSIO, D. L., CICARELLI, R. M., BOLZANI, V. S., KATO, M. J., NAFIE, L. A., LÓPEZ, S. N.,

FURLAN, M. Absolute configuration and selective trypanocidal activity of gaudichaudianic acid enantiomers. **J. Nat. Prod.**, v. 74, p. 1154–1160, Abr/2011.

BERMUDEZ, J., DAVIES, C., SIMONAZZI, A., REAL, J. P., PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Trop.** v. 156. p. 1-16. Abr/2016.

BHANDARI, M., RAJ, S. Practical approach to green chemistry. **Int. J. Pharm. Sci.** v. 9. p. 10-26. 2017.

BLAU, L., MENEGON, R. F., TROSSINI, G. H., MOLINO, J. V., VITAL, D. G., CICARELLI, R. M., PASSERINI, G. D., BOSQUESI, P. L., CHIN, C. M. Design, synthesis and biological evaluation of new aryl thiosemicarbazone as antichagasic candidates. **Eur. J. Med. Chem.** v. 63. p. 142-151. Set/2013.

BÖHM, H. J., FLOHR, A., STAHL, M. Scaffold hopping. **Drug Discov. Today Technol.**, v. 1, p. 217-224, Dez/2004.

BRANQUINHA, M. H., OLIVEIRA, S. S., SANGENITO, L. S., SODRE, C. L., KNEIPP, L. F., d'AVILA-LEVY, C. M., SANTOS, A. L. Cruzipain: An Update on its Potential as Chemotherapy Target against the Human Pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Med. Chem.** v. 22. p. 2225-2235. 2015.

BRINGMANN, G., HERTLEIN-AMSLINGER, B., KAJAHN, I., DREYER, M., BRUN, R., MOLL, H., STICH, A., IOSET, K. N., SCHMITZ, W., NGOCL. H. Phenolic analogs of the N,C-coupled naphthylisoquinoline alkaloid ancistrocladinium A, from *Ancistrocladus cochinchinensis* (Ancistrocladaceae), with improved antiprotozoal activities. **Phytochem.** v. 72. p. 89-93. Jan/2011.

BRITO, C. L. *Antichagásicos potenciais: síntese e estudo do comportamento voltamétrico de bioisósteros do nitrofurais*. Dissertação de Mestrado. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP**, São Paulo, 2010, 97 p.

BROWN, B. A. In: *Hematology: principles and procedures*. 6ed. Philadelphia. Lea & Febiger. 1993. 452p.

CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. **J. Biol. Mol. Screen.** v. 20. p. 22-35. Jan/2015.

CHIRAC, P., TORRELE, E. Global framework on essential health R&D. **Lancet.** v. 367. p. 1560-1561. Mai/2006.

computation, statistics and chemistry. **Educ. Quim.**, v. 25(4), p. 418-424, 2014.

CORREIA, P. R. M., FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Quím. Nova**, v. 30(2), p. 481-487, 2007.

COSTA, L. V., CARDOSO, M. V., de OLIVEIRA FILHO, G. B., de MORAES GOMES, P. A., ESPÍNDOLA, J. W., de JESUS SILVA, T. G., TORRES, P. H., SILVA JUNIOR, F. P., MARTIN, J., de FIGUEIREDO, R. C., LEITE, A. C. Compound profiling and 3D-QSAR studies of hydrazone derivatives with activity against intracellular *Trypanosoma cruzi*. **Bioor. Med. Chem.** v. 24, 8. p. 1608-1618. Abr/2016.

COURA, J. R. Special issue on Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 110, p. 275-276, Mai/2015a.

COURA, J. R. The main scenarios of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 110, p. 277-282, Mai/2015b.

COURA, J. R., DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 104, p. 31-40, Jul/2009.

DNDi (Drugs for Neglected Diseases *initiative*). *What is Chagas Disease?* About Chagas disease. 2017.

ELISABETSKY, Elaine. Etnofarmacologia. **Cienc. Cult.** São Paulo, v. 55, p. 35-36 Set/2003.

ESPÍNDOLA, J. W., CARDOSO, M. V., FILHO, G. B., OLIVEIRA e SILVA, D. A., MOREIRA, D. R., BASTOS, T. M., SIMONE, C. A., SOARES, M. B., VILLELA, F. S., FERREIRA, R. S., CASTRO, M. C., PEREIRA, V. R., MURTA, S. M., SALES JUNIOR, P. A., ROMANHA, A. J., LEITE, A. C. Synthesis and structure-activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxyl thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi* cruzain. **Eur. J. Med. Chem.** v. 101. p. 818-835. Ago/2015.

EZZAT, S. M., SALAMA. M. M., MAHROUS, E. A., MAES, L., PAN, C. H., ABDEL-SATTAR, E. Antiprotozoal activity of major constituents from the bioactive fraction of *Verbesina encelioides*. **Nat. Prod. Reas.** v. 6. p. 676-680. Mar/2016.

FELIPPE, L. G., BALDOQUI, D. C., KATO, M. J., BOLZANI, V. S., GUIMARÃES, E. F., CICARELLI, R. M. FURLAN, M. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Piperomia blanda*. **Phytochem.** v. 69, p. 445–450, Jan/2008.

FERNANDES, J. P. S., SAVINO, G., AMARANTE, A. C. G., SOUSA, M. R., SILVA, G. R., CIANCIULLI, M. E., CORRÊA, M. F., FERRARINI, M. Estudo das relações entre estrutura e atividade de parabenos: uma aula prática. **Química Nova**, v. 36(6). p. 890-893. 2013.

FERNANDES, J.P.S., PAVAN, F.R., LEITE, C.Q.F., FELLI, V.M.A. Synthesis and evaluation of a pyrazinoic acid prodrug in *Mycobacterium tuberculosis*. **Saudi Pharmceut.J.** v. 22. p. 376-380. Set/2014.

FERREIRA, J. E. V., da COSTA, C. H. S., MIRANDA, R. M., FIGUEIREDO, A. F., GINARTE, M. A. An interdisciplinary study on monosubstituted benzene involving computation, statistics and chemistry. **Educ. Quím.**, v. 25(4), p. 418-424, 2014.

FERREIRA, J. E. V., da COSTA, C. H. S., MIRANDA, R. M., FIGUEIREDO, A. F., GINARTE, Y. M. A. An interdisciplinary study on monosubstituted benzene involving FIELD, M. C., HORN, D., FAIRLAMB, A. H., FERGUSON, M. A., GRAY, D. W., READ, K. D., De RYCKER, M., TORRIE, L. S., WYATT, P. G., WYLLIE, S., GILBERT, I. H. Anti-trypanosomatid drugdiscovery: an ongoing challengeand a continuing need. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 15. p. 217-231. Fev/2017.

FLORES, N., JIMÉNEZ, I. A., GIMÉNEZ, A., RUIZ, G., GUTIÉRREZ, D., BOURDY, G., BAZZOCCHI, I. L. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. **Phytochem.** v. 70, p. 621–627, Mar/2009.

FONSECA, N. C., da CRUZ, L. F., da SILVA VILLELA, F., do NASCIMENTO PEREIRA, G. A., de SIQUEIRA-NETO, J. L., KELLAR, D., SUZUKI, B. M., RAY, D., de SOUZA, T. B., ALVES, R. J., SALES JÚNIOR, P. A., ROMANHA, A. J., MURTA, S. M., McKERROW, J. H., CAFFREY, C. R., de OLIVEIRA, R. B., FERREIRA, R. S. Synthesis of a Sugar-Based Thiosemicarbazone Series and Structure-Activity Relationship versus the Parasite Cysteine Proteases Rhodesain, Cruzain, and *Schistosoma mansoni* Cathepsin B1. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 59, 5. p. 2666-2677. Mai/2015.

FUGANTI, C., MINUT, J., FANTONI, G.P., SERVI, S. On the microbial transformation of α,β -unsaturated aryl ketones by the fungus *Beauveria bassiana*. **J. Mol. Catal. B Enzym.** v. 4. p. 47-52. Jan/1998.

GAFORIO, J. J., SERRANO, M. J., ORTEGA, E., ALGARRA, I., ALVAREZ DE CIENFUEGOS, G. Use of SYTOX Green Dye in the Flow Cytometric Analysis of Bacterial Phagocytosis. **Cytometry**.v. 48, p. 93-96, 2002.

GAUDINO, E. C., CARNAROGLIO, D., MARTINA, K., PALMISANO, G., PENONI, A., CRAVOTTO, G. Highly Efficient Microwave-Assisted CO Aminocarbonylation with a Recyclable Pd(II)/TPP- β -Cyclodextrin Cross-Linked Catalyst. **Org. Process Res. Dev.** v. 19. p. 499-505. Fev/2015.

GEHRKE, S. S., PINTO, E. G., STEVERDING, D., PLEBAN, K., TEMPONE, A. G., HIDER, R. C., WAGNER, G. K. Conjugation to 4-aminoquinoline improves the anti-trypanosomal activity of Deferiprone-type iron chelators. **Bioorg. Med. Chem.** v. 21, p. 805-813, 2013.

GEMAL, A. L., LUCHE, J. Lanthanoids in Organic Synthesis. 6. The Reduction of α -Enones by Sodium Borohydride in the Presence of Lanthanoid Chlorides: Synthetic and Mechanistic Aspects. **J. Am. Chem. Soc.** v. 103. p. 5454-5459. 1981.

GIAROLLA, J. *Síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente antichagásicos e leishmanicidas derivados de hidroximetilnitrofural, 3-hidroxiflavona e quercetina*. Tese de Doutorado. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP**, São Paulo, 2012. 409 p.

GIMÉNEZ, B. G.; SOUZA, M. S.; FERRARINI, M.; FERNANDES, J. P. S. Evaluation of blockbuster drugs under the Rule-of-five. **Die Pharmazie**.v. 65, p. 148-152, 2010.

GOMES, P. A. T. M. *et al.* New 1,3-thiazole derivatives and their biological and ultrastructural effects on *Trypanosoma cruzi*. **Eur. J. Med. Chem.** v. 121. p. 387-398. Out/2016.

GRECCO, S. S., COSTA-SILVA, T. A., JERZ, G., de SOUZA, F. S., ALVES CONSERVA, G. A., MESQUITA, J. T., GALUPPO, M. K., TEMPONE, A. G., NEVES, B. J., ANDRADE C. H., CUNHA, R. L., UEMI, M., SARTORELLI, P., LAGO, J. H. Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of dehydrodieugenol isolated from *Nectandra leucantha* (Lauraceae) and its methylated derivative against *Trypanosoma cruzi*. **Phytomed.**v. 24. p. 62-67. Jan/2017.

GRECCO, S. S., COSTA-SILVA, T. A., JERZ, G., SOUSA, F. S., LONDERO, V. S., GALUPPO, M. K., LIMA, M. L., NEVES, B. J., ANDRADE, C. H., TEMPONE, A. G., LAGO, J. H. G. Neolignans from leaves of *Nectandra leucantha* (Lauraceae) display

in vitro antitrypanosomal activity via plasma membrane and mitochondrial damages. **Chem. Biol. Interact.** v. 277, p. 55-61, 2017.

GRECCO, S. S., REIMÃO, J. Q., TEMPONE, A. G., SARTORELLI, P., ROMOFF, P., FERREIRA, M. J., FÁVERO, O. A., LAGO, J. H. Isolation of an antileishmanial and antitrypanosomal flavanone from the leaves of *Baccharisretusa*DC (Asteraceae). **Parasitol.Res.** v. 106, p. 1245–1248, Abr/2010.

GRECCO, S.S., SARTORELLI, P., REIMÃO, J.Q., TEMPONE, A.G., CUNHA, R.L.O.R., ROMOFF, P., FERREIRA, M.J.P., FAVERO, O.A., LAGO, J.H.G. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC (Asteraceae). **Exp. Parasitol.** v.130. p. 141–145. 2012.

GUTIERREZ, R. M. P., MUÑIZ-RAMIREZ, A., SAUCEDA, J. V. Review: The potential of chalcones as a source of drugs. **Afr. J. Pharm. Pharmacol.**, v. 9(8), p. 237-257, 2015.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontological Electronica**, v. 4, p. 1-9, 2001.

HOPKINS, A. L., GROOM, C. R., ALEX, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. **Drug Discov.Today**, v. 9(10), 430-431, 2004.

HOPKINS, A. L., KESERÜ, G. M., LEESON, P. D., REES, D. C., REYNOLDS, C. H. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. **Nat.Rev.**, v. 13, p. 105-121, 2014.

HOTEZ, P. J., DUMONTEIL, E., WOC-COLBURN, L., SERPA, J. A., BEZEK, S., EDWARDS, M. S., HALLMARK, C. J., MUSSELWHITE, L. W., FLINK, B. J., BOTTAZZI, M. E. Chagas disease: The new HIV/AIDS of the Americas. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 6, e. 1498, Mai/2012.

HUANG, J., ZHANG, J., DONG, Y., GONG, W. An Effective Method To Prepare Imines from Aldehyde, Bromide/Epoxy, and Aqueous Ammonia. **J. Org. Chem.** v. 76. p. 3511-3514. 2011.

ILARI, A., FIORILLO, I. A., GENOVESE, I., COLOTTI, G. Polyamine-trypanothione pathway: an update. **Future Med. Chem.** v. 9. p. 61-77. Jan/2017.

- JARAMILLO, M. A., MANOS, P. S., ZIMMER, E. A., Phylogenetic relationships of the perianthless Piperales: reconstructing the evolution of floral development. **Int. J. Plant Sci.**, v. 165, p. 403-416, Mai/2004.
- KAGAN, V. E., TYURINA, Y. Y. Recycling and redox cycling of phenolic antioxidants. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 854. p. 425-434. Nov/1998.
- KATSUNO, K., BURROWS, J. N., DUNCAN, K., van HUIJSDUIJNEN, R. H., KANEKO, T., KITA, K., MOWBRAY, C. E., SCHMATZ, D., WARNER, P., SLINGSBY, B. T. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nat. Rev. Drug Disc.** v. 14. p. 751-758. Out/2015.
- KESPER, N., ALMEIDA, K. A. de, STOLF, A. M. S., UMEZAWA, E. S. Immunoblot Analysis of Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens as a Tool for the Characterization of Trypanosoma cruzi Strains and Isolates. **J. Parasitol.**, v. 86(4), p. 862-867, 2000.
- KING, G. F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. **Expert Opin. Biol. Ther.**, v. 11(11), p. 1469-1484, 2001.
- KUETE, V., SANDJO, L. P., MBAVENG, A. T., SEUKEP, J. A., NGADJUI, B. T., EFFERTH, T. Cytotoxicity of selected Cameroonian medicinal plants and *Nauclea pouteri* towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. **BMC Compl. Alt. Med.** v. 309, p. 1-9, Set/2015.
- LEMKE, T. L. Antiparasitic agents. In: LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A.; ROCHE, V. F.; ZITO, S. W. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 6 ed., 2008, p. 1094.
- LENARDÃO, E. J., FREITAS, R. A., DABDOUB, M. J., BATISTA, A. C. F., SILVEIRA, C. C. Green chemistry - The 12 principles of green chemistry and its insertion in the teach and research activities. **Quím. Nova** v. 26. p. 123-129. Jan/2003.
- LIMA, T. C., SOUZA, R. J., SANTOS, A. D., MORAES, M. H., BIONDO, N. E., BARISON, A., STEINDEL, M., BIAVATTI, M. W. Evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of phenolic compounds from *Calea uniflora* Less. **Nat. Prod. Res.** v. 30, p. 551-557. 2016.
- LIPINSKI, C. A., LOMBARDO, F., DOMINY, B. W., FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 46, p. 3-26, 2001.

LUCHE, J., RODRIGUEZ-HAHN, L., CRABBÉ, P. Reduction of natural enones in the presence of cerium trichloride. **J. Chem. Soc., Chem. Comm.** v. 14. p. 601-602. 1978.

LUIZE, P. S., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B. P., CORTEZ, D. A., NAKAMURA, C. V. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii*(Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunk against *Trypanosoma cruzi*. **Biol. Pharm. Bull.** v. 29, p. 2126-2130, Out/2006.

MACIEL, D. da S. A., FREITAS, V. P., CONSERVA, G. A., ALEXANDRE, T. R., PURISCO, S. U., TEMPONE, A. G., MELHEM, M. S., KATO, M. J., GUIMARÃES, E. F., LAGO, J. H. Bioactivity-guided isolation of laevicarpin, an antitrypanosomal and anticryptococcal lactam from *Piper laevicarpu* (Piperaceae). **Fitoterapia**. v. 111. p. 24-28. Junho/2016.

MARCHAND, P., GRIFFE, L., POUPOT, M., TURRIN, C.O., BACQUET, G., FOURNIÉ, J.J., MAJORAL, J.P., POUPOT, R., CAMINADE, A.M. Dendrimers ended by non-symmetrical azadiphosphonate groups: Synthesis and immunological properties. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 19. p. 3963-3966. Jul/2009.

MARTINS, R. C. C., LAGO, J. H., ALBUQUERQUE, S., KATO, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochem.** v. 64, p. 667-670, Set/2003.

MARTINS-MELO, F. R., ALENCAR, C. H., RAMOS, A. N. Jr, HEUKELBACH, J. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999–2007. **PLOS Negl. Trop. Dis.** v. 6, e. 1508, p. 1-8, Fev/2012.

MASUDA, T., JITOE, A., ISOBE, J., NAKATANI, N., YONEMORI, S. Anti-oxidative and anti-inflammatory curcumin related phenolics from rhizomes of *Curcuma domestica*. **Phytochem.** v. 32. p. 1557-1560. 1993.

MATSUMOTO, K., SHIMAZAKI, H., MIYAMOTO, Y., SHIMADA, K., HAGA, F., YAMADA, Y., MIYAZAWA, H., NISHIWAKI, K., KASHIMURA, S. Simple and convenient synthesis of esters from carboxylic acids and alkyl halides using tetrabutylammonium fluoride. **J. Oleo Sci.** v. 63(5), p. 539-544, 2014.

MAYA, J. D., CASSELS, B. K., ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P., FERREIRA, J., FAÚNDEZ, M., GALANTI, N., FERREIRA, A., MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp. Biochem. Phys. Mol. Integr. Physiol.**, v. 146, p. 601-620, Abr/2007.

MESQUITA, J. T., COSTA-SILVA, T. A., BORBOREMA, S. E., TEMPONE, A. G. Activity of imidazole compounds on *Leishmania (L.) infantum* chagasi: reactive oxygen species induced by econazole. **Mol. Cell.Biochem.** v. 389, p. 293-300, 2014.

MOITA NETO, J. M., MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Quím.Nova**, v. 21(4), p. 467-469, 1998.

MOLYNEUX, D. Neglected tropical diseases. **Comm.Eye Health J.**v. 26. p. 21-24. 2013.

MONTEIRO, D.; GUIMARÃES, E. F. Flora do Parque Nacional do Itatiaia – Brasil: Manekia e Piper (Piperaceae). **Rodriguésia**, v. 60, p. 999-1024, 2009.

MORAN, M., GUZMAN, J., ROPARS, A., McDONALD, A., JAMESON, N., OMUNE, B., RYAN, S., WU, L. Neglected Disease Research and Development:How Much Are We Really Spending?**PLoS Med.**v.6. p. 137-146. Fev/2009.

MOREIRA, D. R. M., de OLIVEIRA, A. D., GOMES, P. A. T. M., de SIMONE, C. A., VILLELA, F. S., da SILVA, A. C., dos SANTOS, T. A., BELAZ de CASTRO, M. C., PEREIRA, V. R., LEITE, A. C. Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* compounds which induce apoptotic parasite death. **Eur. J. Med. Chem.** v. 21, 75. p. 467-478. Mar/2014.

NAGAJYOTHI, F., MACHADO, F. S., BURLEIGH, B. A., JELICKS, L. A., SCHERER, P. E., MUKHERJEE, S., LISANTI, M. P., WEISS, L. M., GARG, N. J., TANOWITZ, H. B. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cell.Microbiol.**v. 5. p.634-643. Mai/2012.

NEVES, D. P. *et al.* In: *Parasitologia Humana*. 11 ed., São Paulo: Atheneu, 2004. 494 p.

OLIVEIRA FILHO, G. B., de OLIVEIRA CARDOSO, M. V., ESPÍNDOLA, J. W., FERREIRA, L. F., de SIMONE, C. A., FERREIRA, R. S., COELHO, P. L., MEIRA, C. S., MAGALHÃES MOREIRA, D. R., SOARES, M. B., LIMA LEITE, A. C. Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of 4-thiazolidinones against *Trypanosoma cruzi*. **Bioor. Med. Chem.** v. 23, 23. p. 7478-7486. Dez/2015.

OLIVEIRA, A., MESQUITA, J. T., TEMPONE, A. G., LAGO, J. H., GUIMARÃES, E. F., KATO, M. J. Leishmanicidal activity of an alkenylphenol from *Piper malacophyllum* is related to plasma membrane disruption. **Exp. Parasitol.**v. 132, p. 383-387. Nov/2012.

OTERA, J. Transesterification **Chem Rev.**, v. 93, p. 1449-1470, 1993.

OTILIE, S., GOLDOF, G. M., CALVET, C. M., JENNINGS, G.K., LaMONTE, G., SCHENKEN, J., VIGIL, E., KUMAR, P., McCALL, L.I., LOPES, E.S., GUNAWAN, F., YANG, J., SUZUKI, Y., SIQUEIRA-NETO, J.L., McKERROW, J. H., AMARO, R.E., PODUST, L.M., DURRANT, J.D., WINZELER, E.A. Rapid Chagas Disease Drug Target Discovery Using Directed Evolution in Drug-Sensitive Yeast. **ACS Chem Biol.** v. 12. p. 422-434. Feb/2017.

PATHAK, G., DAS, D., ROKHUM, L. A Microwave-Assisted Highly Practical Chemoselective Esterification and Amidation of Carboxylic Acids. **RSC Adv.** v. 6. p. 93729-93740. 2016.

PATRICK, G. L. An Introduction to Medicinal Chemistry, 5^a ed, Oxford, 2013.

PATTERSON, A. E., FLEWELLING, A. J., CLARK, T. N., GEIER, S. J., VOGELS, C. M., MASUDA, J. D., GRAY, C. A., WESTCOTT, S. A. Antimicrobial and antimycobacterial activities of aliphatic amines derived from vanillin. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 93, p. 1305-1311, 2015.

PEDROSA, R. C., Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. *Redox Rep.*, v. 6, p. 265-270, 2001.

PELIZZARO-ROCHA, K., VEIGA-SANTOS, P., ROCHA, K., SILVA, S. UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B., XIMENES, V. F., NAKAMURA, C. V. The trypanocidal action of eupomatenoid-5 isolated from *Piper regnellii* var. *pallenscens* may be related to an imbalance between the antioxidant system and ROS. **Planta Med.** v. 76, p. 1314-1314. Ago/2010.

PEREIRA, P.C.M., NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** v. 19. p. 1-17. Dez/2013

PÉREZ-MOLINA, J. A., PEREZ, A. M., NORMAN, F. F., MONGE-MAILLO, B., LÓPEZ-VÉLEZ, R. Old and new challenges in Chagas disease. **Lancet Infect. Dis.** v. p. 1347-1356. Nov/2015.

PISTE, P. B. Synthesis of Chalcones by grindstone chemistry as an intermediate in Organic Synthesis. **Int. J. Curr. Sci.** v. 13. p. 62-66. Set/2014.

RAHMAN, A. F. M. M., ALI, R., JAHNG, Y., KADI, A. A. Facile Solvent Free Claisen-Schmidt Reaction: Synthesis of α , α' -bis-(Substituted-benzylidene)cycloalkanones and α , α' -bis-(Substituted-alkylidene)cycloalkanones. *Molecules*. v. 17. p. 571-583. Jan/2012.

RAJÃO, M. A., FURTADO, C., ALVES, C. L., PASSOS-SILVA, D. G., de MOURA, M. B., SCHAMBER-REIS, B. L., KUNRATH-LIMA, M., ZUMA, A. A., VIEIRA-da-ROCHA, J. P., GARCIA, J. B., MENDES, I. C., PENA, S. D., MACEDO, A. M., FRANCO, G. R., de SOUZA-PINTO, N.C., de MEDEIROS, M. H., CRUZ, A. K., MOTTA, M. C., TEIXEIRA, S. M., MACHADO, C. R. Unveiling benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Environ. Mol. Mutagen.** v. 55, p. 309-321, Mai/2014.

RAMÍREZ-MACÍAS, I., MARÍN, C., CHANBOUN, R., MESSOURI, I., OLMO, F., ROSALES, M. J., GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, R., ALVAREZ-MANZANEDA, E., SÁNCHEZ-MORENO, M. In vitro and in vivo studies of the trypanocidal activity of four terpenoid derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 87(3), p. 481–488, Set/2012.

RASSI, A. Jr, RASSI, A., RASSI, S. G. Heart disease in latin America - Predictors of mortality in chronic Chagas disease: A systematic review of observational studies. **Am. Heart Assoc.** v. 115, p. 1101-1108, Mar/2007.

RAYAR, A., VEITÍA, M. S., FERROUD, C. An efficient and selective microwave-assisted Claisen-Schmidt reaction for the synthesis of functionalized benzalacetones. **SpringerPlus**, v. 4, 221, 2015.

REA, A., TEMPONE, A. G., PINTO, E. G., MESQUITA, J. T., RODRIGUES, E., SILVA, L. G., SARTORELLI, P., LAGO, J. H. Soulamarin Isolated from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) Induces Plasma Membrane Permeabilization of *Trypanosoma cruzi* and Mitochondrial Dysfunction. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 7, 12. e. 2556. Dez/2013.

REITHINGER, R., TARLETON, R. L., URBINA, J., A., KITRON, U., GÜRTLER, R. E. Eliminating Chagas disease: Challenges and a roadmap. **Br. Med. J.** v. 338, p. 1044-1047, Abr/2009.

RIBEIRO, I., SEVCSIK, A. M., ALVES, F., DIAP, G., DON, R., HARHAY, M. O., CHANG, S., PECOUL, B. New improved treatments for Chagas disease: From the R&D pipeline to the patients. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 3, e. 484, Jul/2009.

RIBEIRO, T. S., FREIRE-de-LIMA, L., PREVIATO, J. O., MENDONÇA-PREVIATO, L., HEISE, N., de LIMA, M. E. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 14, p. 3555-3558, Jul/2004.

RITTER, J. J., MINIERI, P. P. A New Reaction of Nitriles. I. Amides from Alkenes and Mononitriles. **J. Am. Chem. Soc.** v. 70. p. 4045-4048. Dez/1948.

RIVAROLA, H. W., PAGLINI-OLIVA, P. A. Trypanosoma cruzi Trypanothione Reductase Inhibitors: Phenothiazines and Related Compounds Modify Experimental Chagas' Disease Evolution. **Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.** v. 2. p. 43-52. Jun/2002.

ROTHENBERG, G., DOWNIE, A. P., RASTON, C. L., SCOTT, J. L. Understanding Solid/Solid Organic Reactions. **J. Am. Chem. Soc.** v. 123. p. 8701-8708. Set/2001.

RUANGRUNGSI, N., PRATHANTURARUG, S., LANGE, G. L., ORGAN, M. G. An *N*-methyl aristolactam and an oxygenated cyclohexane derivative from *Piper ribesioides*. **Phytochem.**, v. 31, p. 2397-2400, Jul/1992.

SAIKIA, L., BARUAH, J. M., THAKUR, A. J. A rapid, convenient, solventless green approach for the synthesis of oximes using grindstone chemistry. **Org. Med. Chem. Lett.** v. 1. p. 1-12. Out/2011.

SANDJO, L. P., de MORAES, M. H., KUETE, V., KAMDOUM, B. C., NGADJUI, B. T., STEINDEL, M. Individual and combined antiparasitic effect of six plant metabolites against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Bioor. Med. Chem. Lett.** v. 26, 7. p. 1772-1775. Abr/2016.

SANTOS FILHO, J. M., PINHEIRO, S. M. Stereoselective, solvent free, highly efficient synthesis of aldo- and keto-N-acylhydrazones applying grindstone chemistry. **Green Chem.** v. 19. p. 2212-2224. 2017.

SANTOS, L. de A., CAVALHEIRO, A. J., TEMPONE, A. G., CORREA, D. S., ALEXANDRE, T. R., QUINTILIANO, N. F., RODRIGUES-OLIVEIRA, A. F., OLIVEIRA-SILVA, D., MARTINS, R. C., LAGO, J. H. Antitrypanosomal Acetylene Fatty Acid Derivatives from the Seeds of *Porcelia macrocarpa* (Annonaceae). **Molecules** v. 20, 5. p. 8168-8180. Mai/2015.

SANTOS, T. G., REBELO, R. A., DALMARCO, E. M., GUEDES, A., GASPER, A. L., CRUZ, A. B., SCHMIT, A. P., CRUZ, R. C. B., STEINDEL, M. NUNES, R. K. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC. **Quim. Nova.** v. 35. p. 477-481. 2012.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 102. p. 75-85, Out/2007.

SERAFIM, R. *Antichagásicos potenciais: estudos sobre a síntese de pró-fármacos recíprocos de bioisósteros do hidroximetilnitrofurais e de liberador de óxido nítrico*. Dissertação de Mestrado. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP**, São Paulo, 2011, 90 p.

SHADNIA, H., WRIGHT, J. S. Understanding the Toxicity of Phenols: Using Quantitative Structure-Activity Relationship and Enthalpy Changes To Discriminate between Possible Mechanisms. **Chem. Res. Toxicol.** v. 21. p. 1197-1204. Jun/2008.

SILVA, E. B., OLIVEIRA e SILVA, D. A., OLIVEIRA, A. R., da SILVA MENDES, C. H., dos SANTOS, T. A., da SILVA, A. C., de CASTRO, M. C., FERREIRA, R. S., MOREIRA, D. R., CARDOSO, M. V., de SIMONE, C. A., PEREIRA, V. R., LEITE, A. C. Design and synthesis of potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. **Eur. J. Med. Chem.** v. 133. p. 39-50. Abr/2017.

SILVA, R. A.; BIEBER, L. W.; ESTEVAM, I. H. S. **Tetrahed. Lett.** v. 48. p. 7680-7682. 2007.

SMITH, M. B., MARCH, J. March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 6^a ed., 2007. 2357p.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Química Orgânica, 10^a ed., v. 2, 2012. 494p.

SUETH-SANTIAGO, V., DECOTE-RICARDO, D., MORROT, A., FREIRE-de-LIMA, C. G., LIMA, M. E. Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. **World J. Biol. Chem.** v. 26. p. 57-80. Fev/2017.

TEIXEIRA, A.R.L., NASCIMENTO, R.J., STURM, N.R. Evolution and pathology in Chagas disease - a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 101. p. 463-491. Ago/2006.

TEMPONE, A. G., SARTORELLI, P., MADY, C., FERNANDES, F. Natural Products to Anti-trypanosomal Drugs: An Overview of New Drug Prototypes for American Trypanosomiasis. **Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.** v. 5. p. 222-235. Jul/2007.

TROCHINE, A., CREEK, D. J., FARAL-TELLO, P., BARRETT, M. P., ROBELLO, C. Benzimidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, e. 2844, Mai/2014.

VARELA, M. T., DIAZ, R. Z., MARTINS, L. F., FERREIRA, D. D., TEMPONE, A. G., UENO, K., LAGO, J. H., FERNANDES, J. P. Gibbibilimbol B analogues as antiparasitic agents – synthesis and biological activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania (L.) infantum*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 26, p. 1180-1183, Fev/2016.

VARELA, M. T., LIMA, M. L., GALUPPO, M. K., TEMPONE, A. G., de OLIVEIRA, A., LAGO, J. H. G., FERNANDES, J. P. S. New alkenyl derivative from *Piper malacophyllum* and analogues: Antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. **Chem. Bio. Drug Design**. v. 90. p. 1007-1011. 2017..

VEIGA-SANTOS, P., DESOTI, V. C., MIRANDA, N., UEDA NAKAMURA, T., DIAS-FILHO, B. P., SILVA, S. O., de MELLO, J. C., NAKAMURA, C. V. The natural compounds piperovatine and piperlonguminine induce autophagic cell death on *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop.** v. 125. p. 349-356. Mar/2013.

VERDONK, M. L., REES, D. C. Group efficiency: a guideline for hits-to-leads chemistry. **ChemMedChem**, v.3(8), p. 1179-1180, 2008.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**. v. 29. p. 326-337. Abr/2006.

VITAL, D. G., DAMASCENO, F. S., RAPADO, L. N., SILBER, A. M., VILLELA, F. S., FERREIRA, R. S., MALTAROLLO, V. G., TROSSINI, G. H. Application of bioisosterism in design of the semicarbazone derivatives as cruzain inhibitors: a theoretical and experimental study. **J. Biomol. Struct. Dyn.** v. 35, 6. p. 1244-1259. Mai/2017.

WARD, D. E., RHEE, C. K. Chemoselective reductions with sodium borohydride. **Can. J. Chem.** v. 67. p. 1206-1211. Jan/1989.

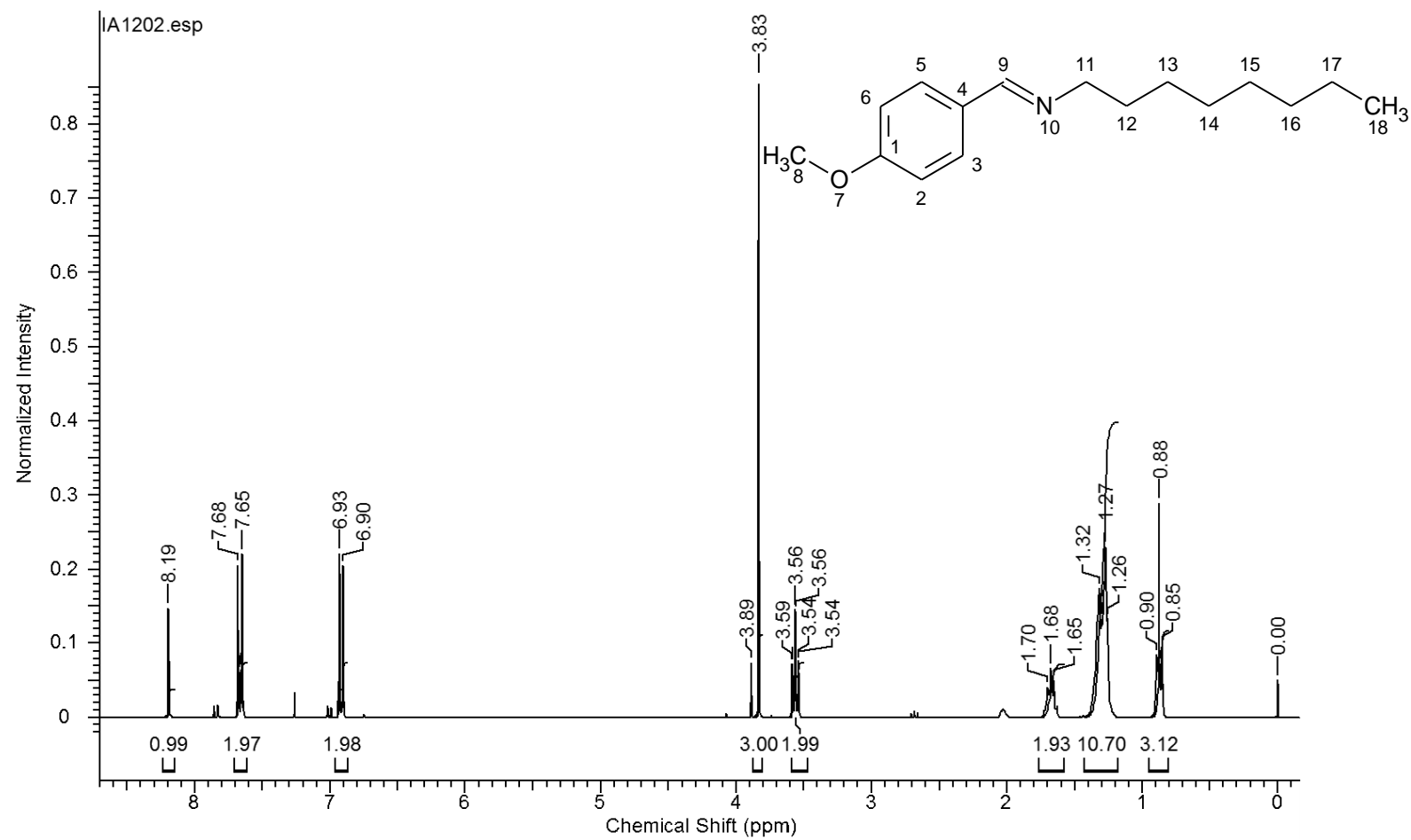
WARD, J. H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **J. Am. Stat. Assoc.**, v. 58(301), p. 236-244, 1963.

WATANABE COSTA, R., da SILVEIRA, J. F., BAHIA, D. Interactions between *Trypanosoma cruzi* Secreted Proteins and Host Cell Signaling Pathways. **Front. Microbiol.** v. 7. Mar/2016.

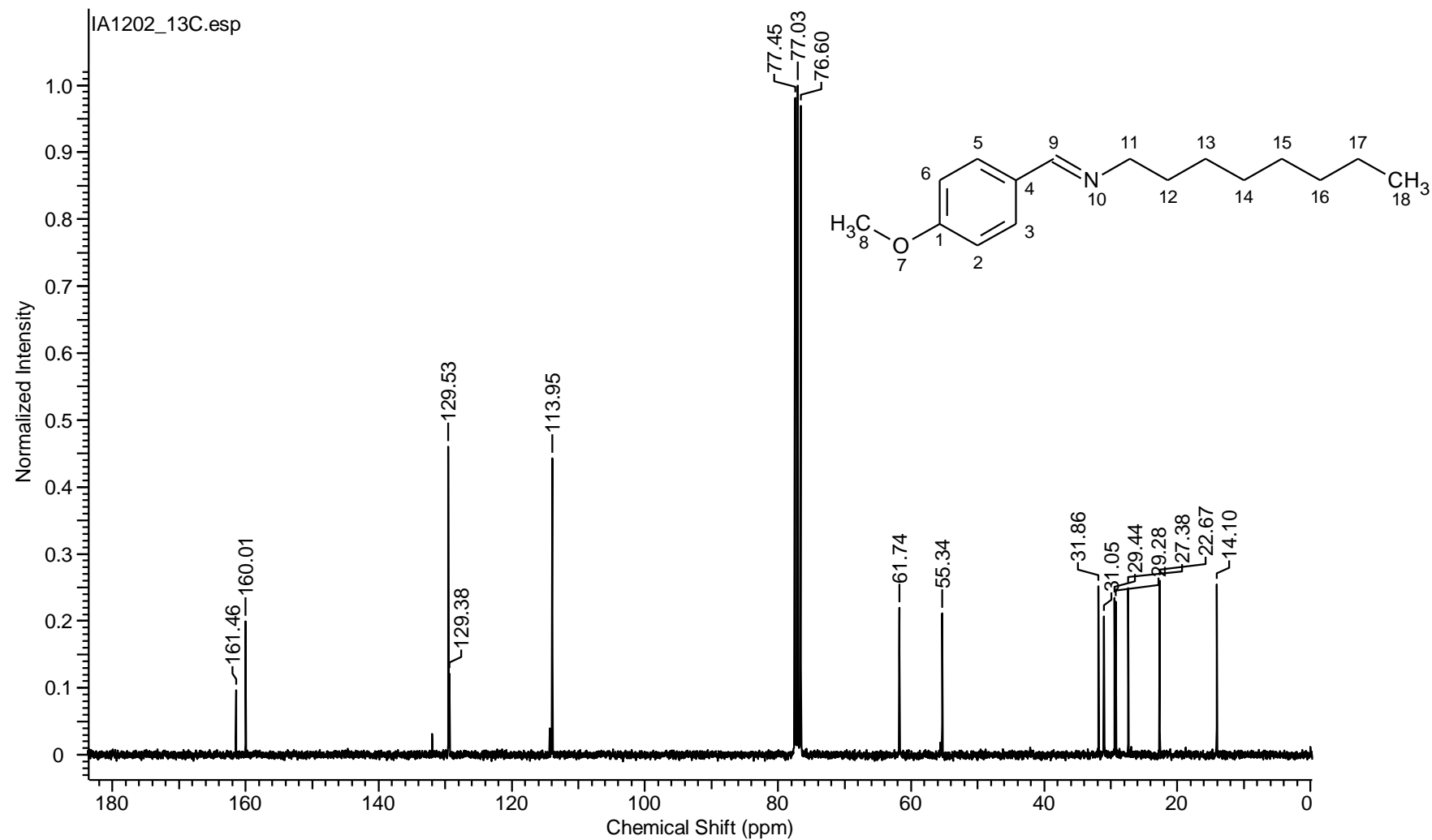
- WEISCHENFELDT, J., PORSE, B. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. **Cold Spring Harb Prot.**v. 3.Dez/2008.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) *Research priorities for Chagas disease, human african trypanosomiasis and leishmaniasis*, 2012, 116 p.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION).Chagas disease in LatinAmerica: an epidemiologicalupdate based on 2010. **Weekly Epidem.Rec.** v. 90. p. 33-44. 2015.
- YARDLEY, V., GAMARRO, F., CROFT, S. L. Antileishmanial and antitrypanosomal activities of the 8-aminoquinoline tafenoquine.**Antimicrobiol.Agents Chemother.**v, 54(12), p. 5356-5358, 2010.
- ZEYNIZADEH, B. BEHYAR, T. Wet THF as a suitable solvent for a mild and convenient reduction of carbonyl compounds with NaBH₄.**Bull. Chem. Soc. Japan.** v. 78. p. 307-315. 2005.
- ZEYNIZADEH, D., SHIRINI, F. Mild and Efficient Reduction of a,b-Unsaturated Carbonyl Compounds,a-Diketones and Acyloins with Sodium Borohydride/Dowex1-x8 System. **Bull. Korean Chem. Soc.** v. 24, p. 295-298, 2003.
- ZHUANG, C., ZHANG, W., SHENG, C., ZHANG, W., XING, C.,MIAO, Z. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chem. Rev.**, v. 117, p. 7762-7810, 2017.
- ZINGALES, B., MILES, M. A., MORAES, C. B., LUQUETTI, A., GUHL, F., SCHIJMAN, A. G., RIBEIRO, I. Drug discovery for Chagas disease should consider Trypanosoma cruzi strain diversity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 109. p. 828–833. Set/2014.
- .

APÊNDICE

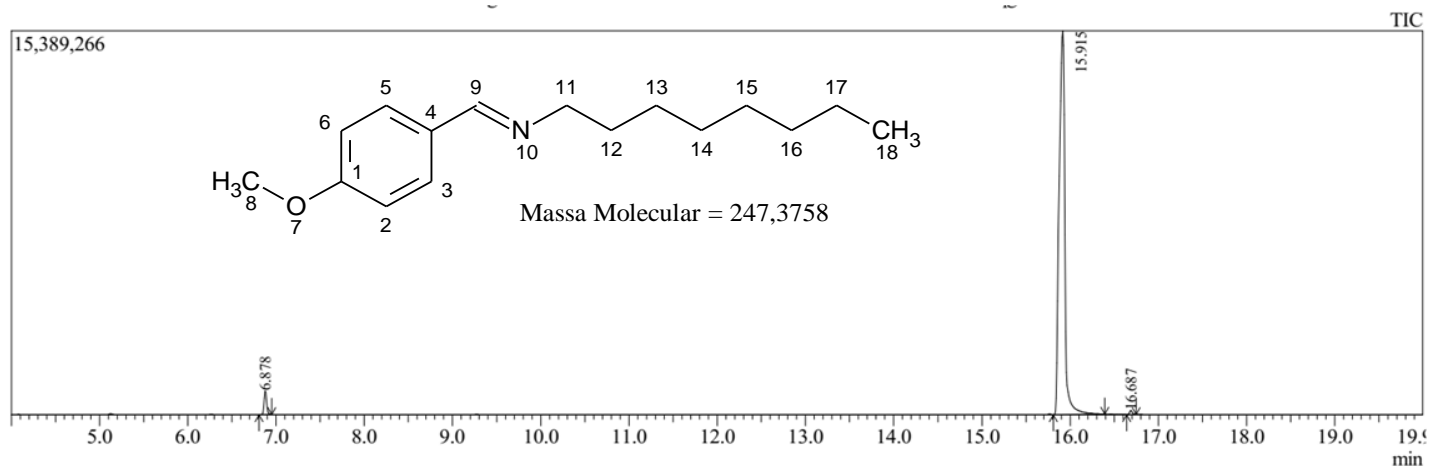
Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H) e Carbono (^{13}C),
Cromatogramas (CG) e Espectros de Massa de Baixa Resolução (EMBR)



Apêndice1: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-18); 1,20-1,40 (m, 10H, H-13/14/15/16/17); 1,60-1,75 (m, 2H, H-13); 3,56 (t, J = 7,1 Hz, 2H, H-11); 3,83 (s, 3H, H-8); 6,88-6,95 (m, 2H, H-2/6); 7,63-7,71 (m, 2H, H-3/5); 8,19 (sl, 1H, H-9).



Apêndice2: ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 14,1 (C-18); 22,7 (C-17); 27,4 (C-13); 29,3 (C-14); 29,4 (C-15); 31,0 (C-12); 31,9 (C-16); 55,3 (C-8); 61,7 (C-11); 113,9 (C-2/6); 129,4 (C-3/5); 129,5 (C-4); 160,0 (C-9); 161,5 (C-1).



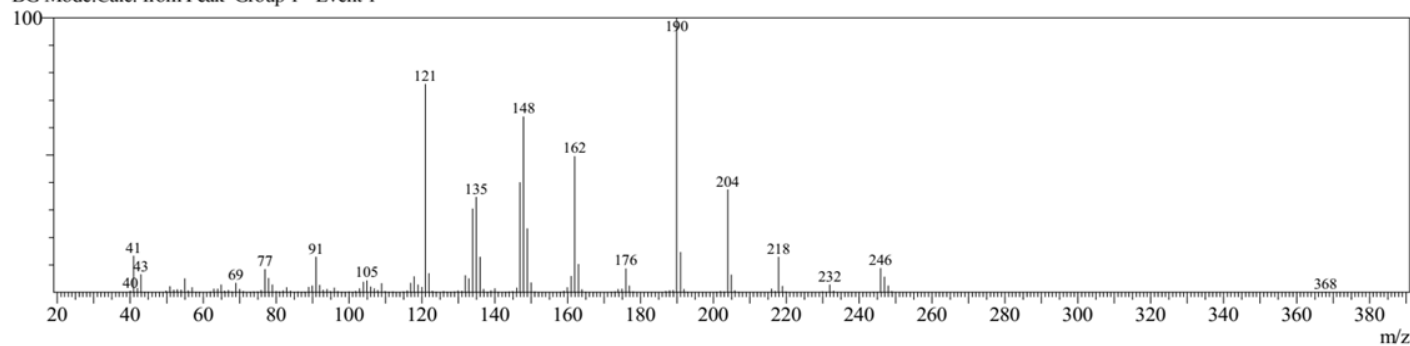
Peak Report TIC									
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark
1	6.878	6.808	6.950	2014161	2.77	954707	5.79	2.11	MI
2	15.915	15.808	16.392	70368801	96.73	15381311	93.22	4.57	MI
3	16.687	16.642	16.750	361762	0.50	163629	0.99	2.21	MI
				72744724	100.00	16499647	100.00		

Line#:2 R.Time:15.917(Scan#:1431)

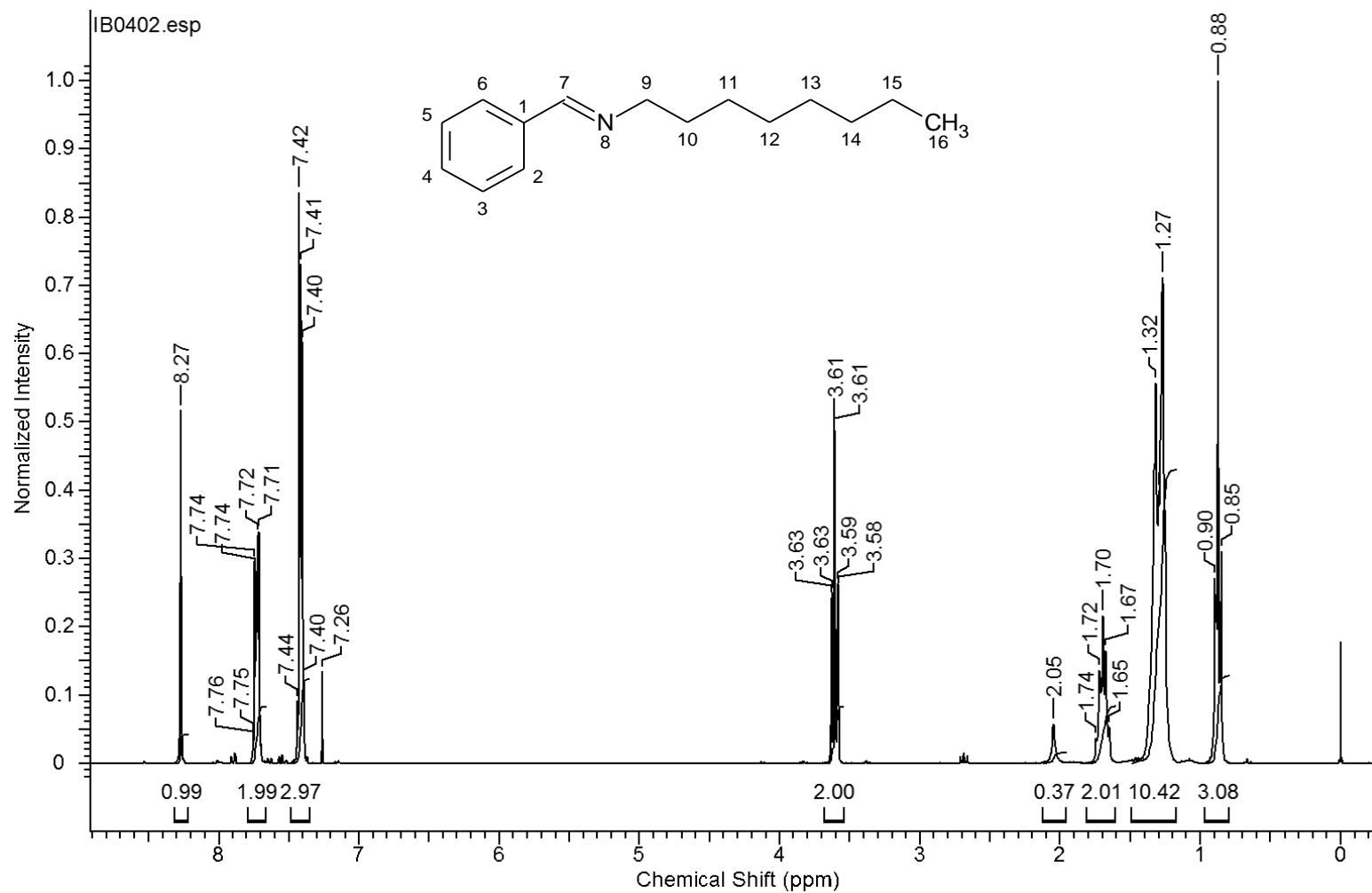
MassPeaks:146

RawMode:Averaged 15.908-15.925(1430-1432) BasePeak:190(2098664)

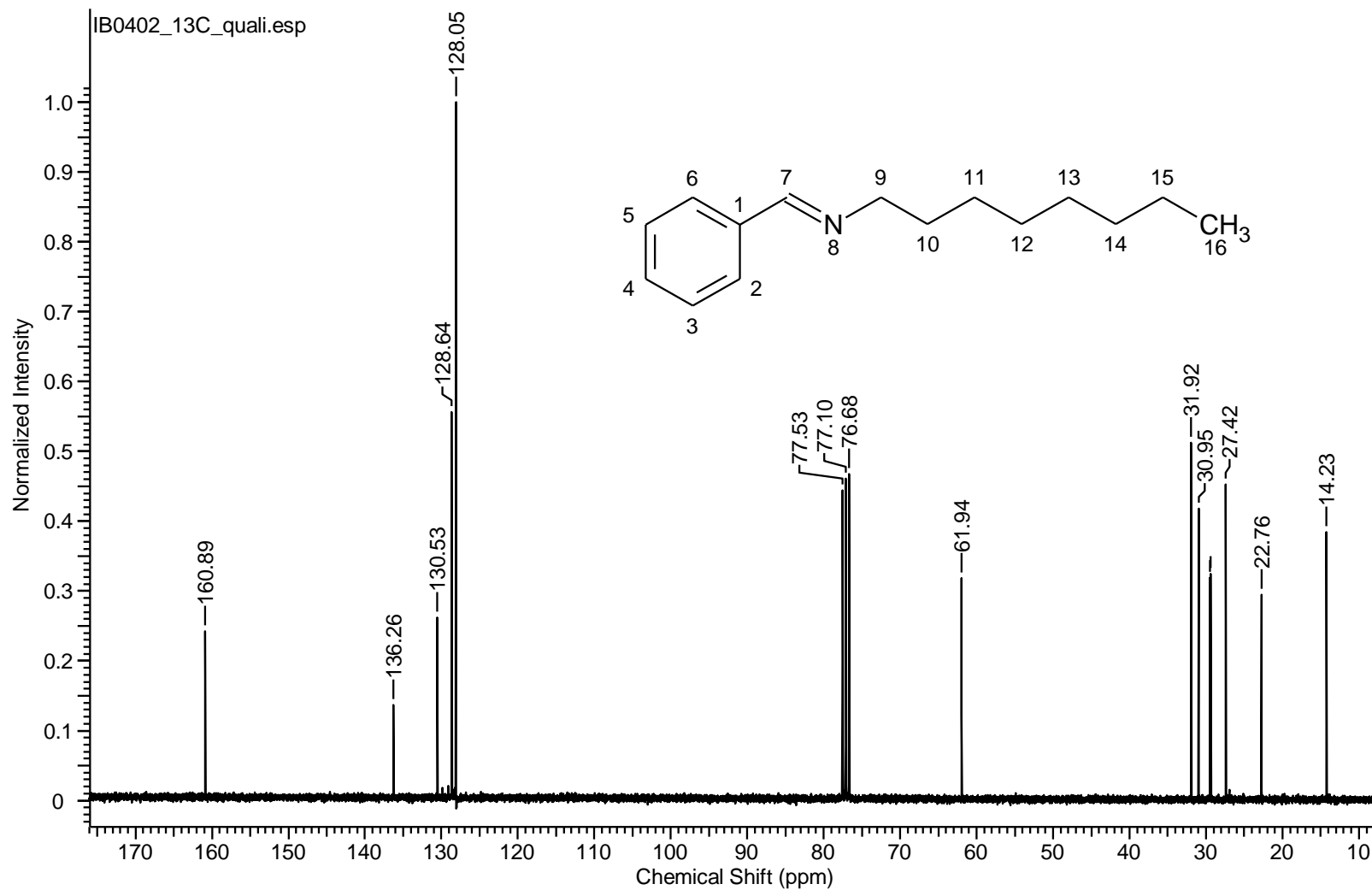
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



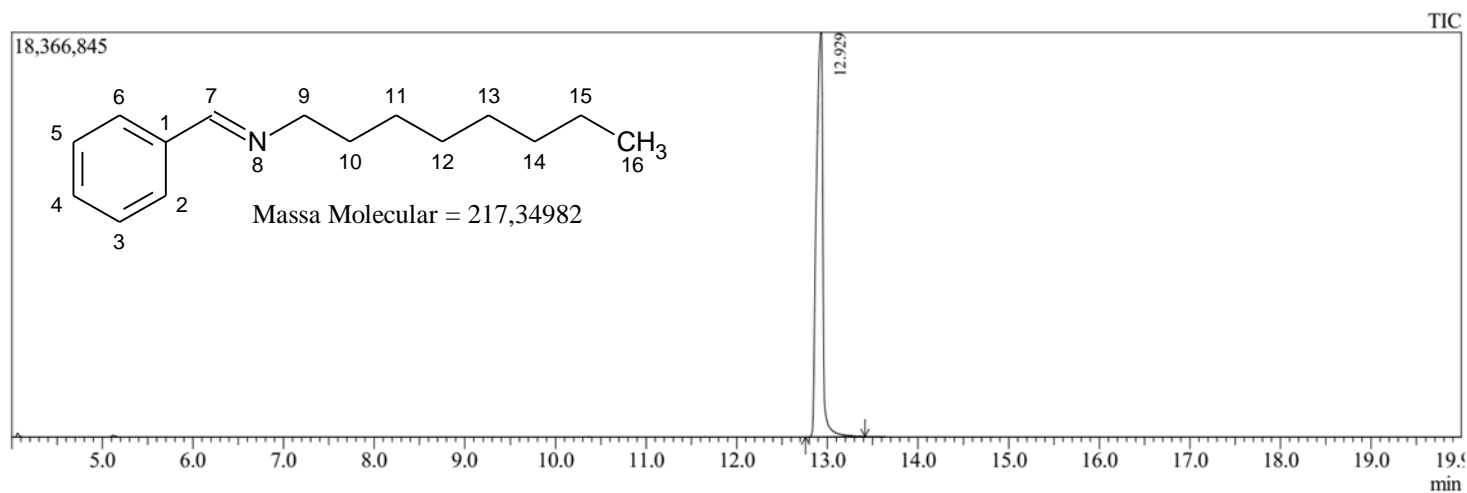
Apêndice 3CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 15,91 min; 247 [M]⁺ (5), 246 (12), 204 (38), 190 (100), 162 (50), 148 (65), 135 (35), 121 (76).



Apêndice4: ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-16); 1,18-1,43 (m, 10H, H-11/12/13/14/15); 1,62-1,77 (m, 2H, H-10); 3,61 (t, J = 7,1 Hz, 2H, H-9); 7,36-7,47 (m, 3H, H-3/4/5); 7,68-7,78 (m, 2H, H-2/6); 8,27 (s, 1H, H-7).



Apêndice5: ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 14,2 (C-16); 22,8 (C-15); 27,4 (C-11); 29,4 (C-12); 29,5 (C-13); 31,0 (C-10); 31,9 (C-14); 61,9 (C-9); 128,1 (C-3/5); 128,6 (C-2/6); 130,5 (C-4); 136,3 (C-1); 160,9 (C-7).



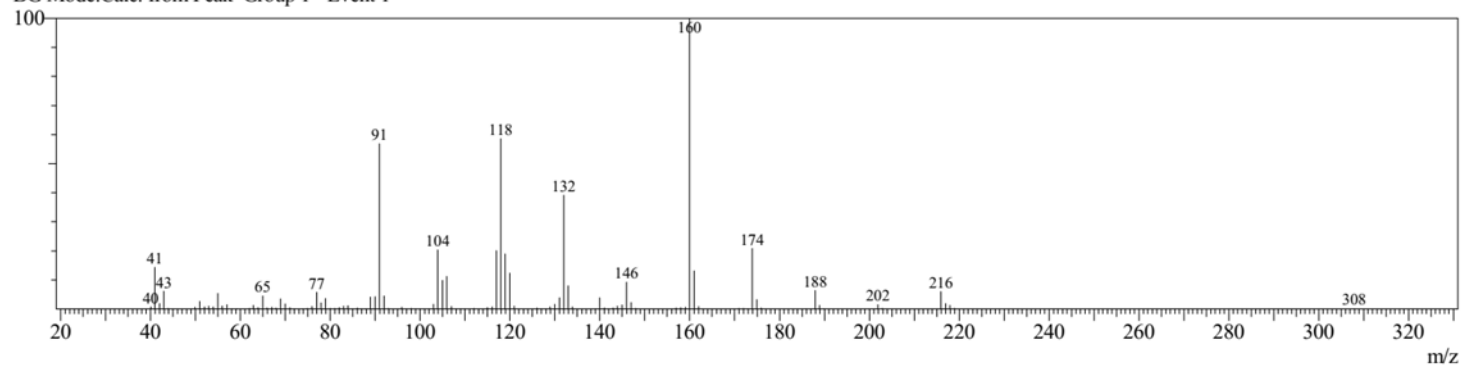
Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	12.929	12.758	13.417	90822069	100.00	18355862	100.00	4.95	MI	
				90822069	100.00	18355862	100.00			

Line#:1 R.Time:12.925(Scan#:1072)

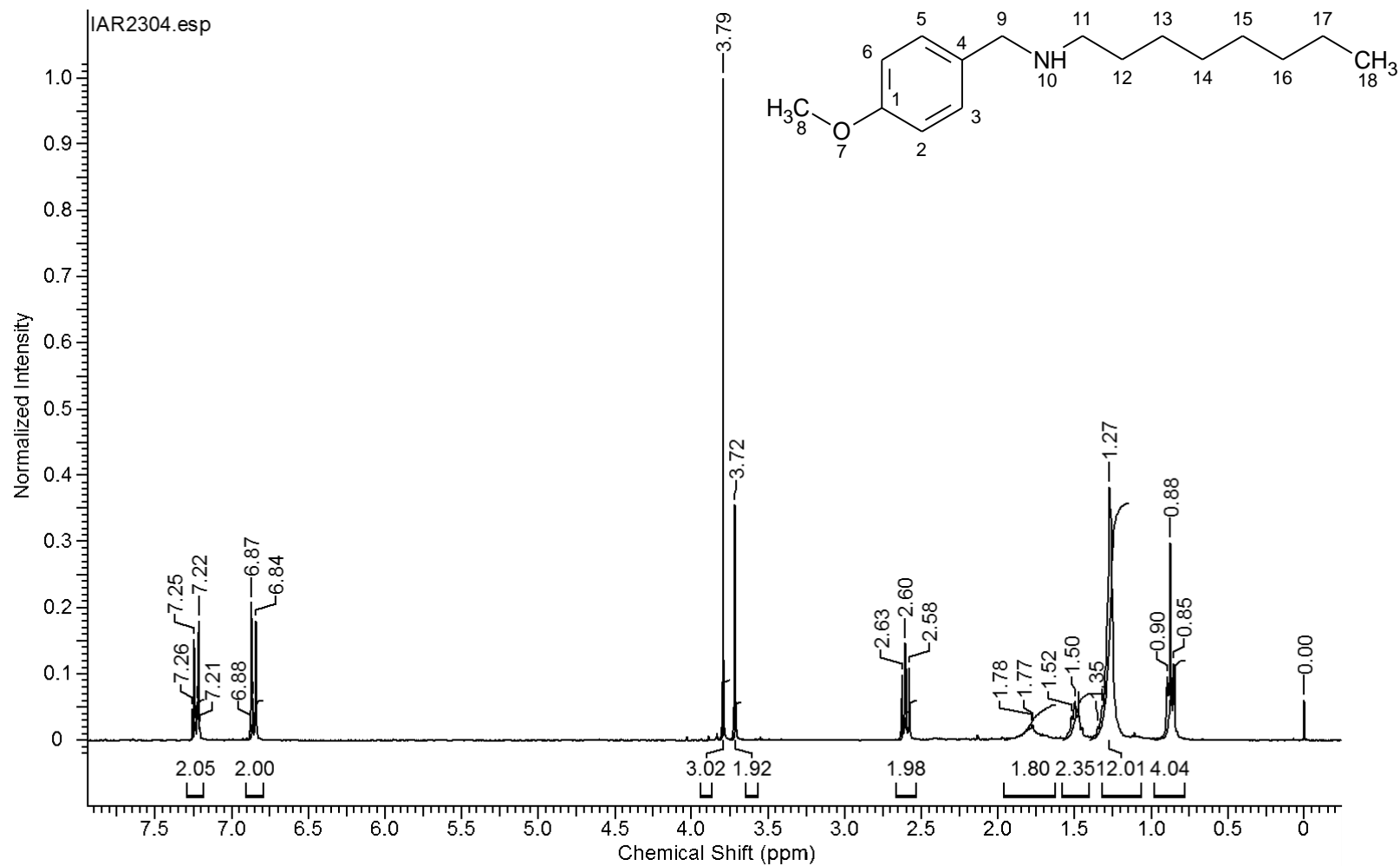
MassPeaks:123

RawMode:Averaged 12.917-12.933(1071-1073) BasePeak:160(3429207)

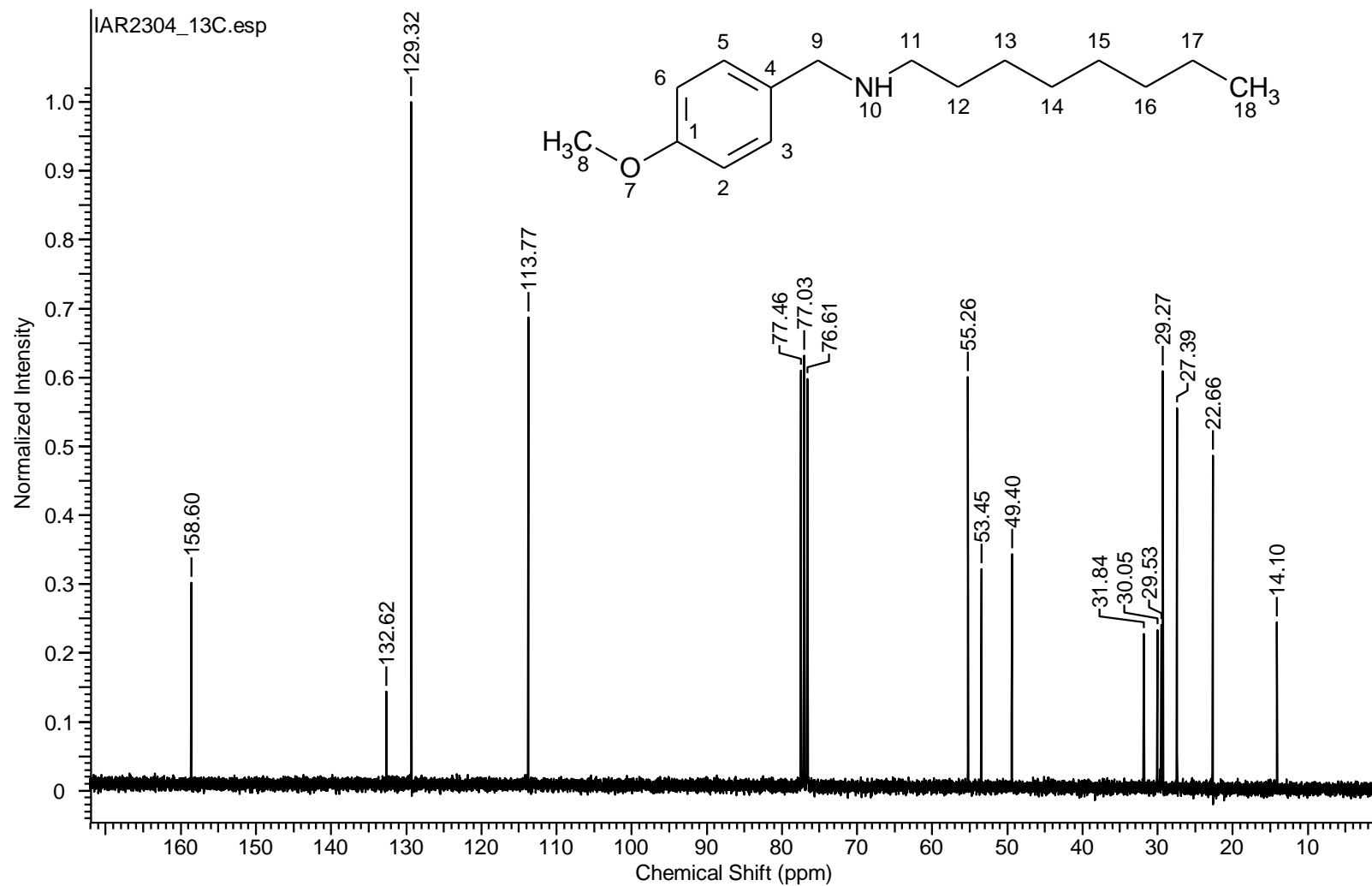
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



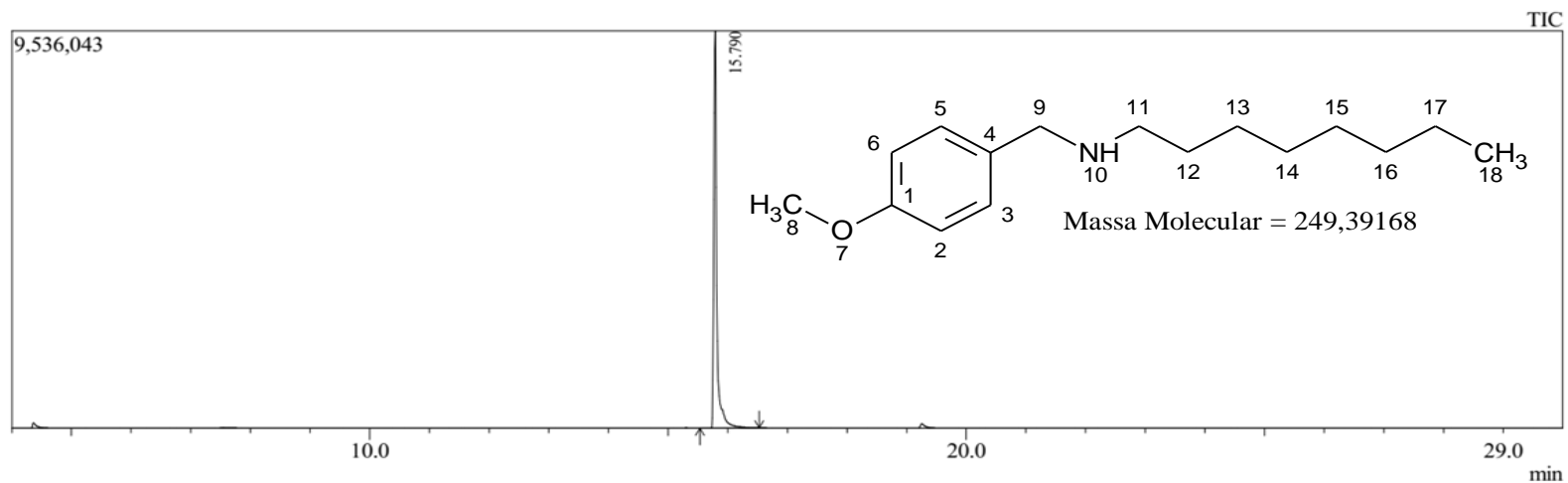
Apêndice 6CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 12,92 min; 217 [M]⁺ (3), 216 (5), 174 (20), 160 (100), 132 (40), 118 (60), 91 (58).



Apêndice7: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-18); 1,20-1,38 (m, 10H, H-13/14/15/16/17); 1,42-1,57 (m, 2H, H-12); 1,77 (sl, 1H, H-10); 2,60 (t, J = 7,2 Hz, 2H, H-11); 3,72 (s, 2H, H-9); 3,79 (s, 3H, H-8); 6,81-6,89 (m, 2H, H-2/6); 7,18-7,28 (m, 2H, H-3/5).



Apêndice8: ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 14,1 (C-18); 22,7 (C-17); 27,4 (C-13); 29,3 (C-14); 29,5(C-15); 30,1 (C-12); 31,8 (C-16); 49,4 (C-11); 53,5 (C-9); 55,3 (C-8); 113,7 (C-2/6); 129,3 (C-3/5); 132,6 (C-4); 158,6 (C-1).



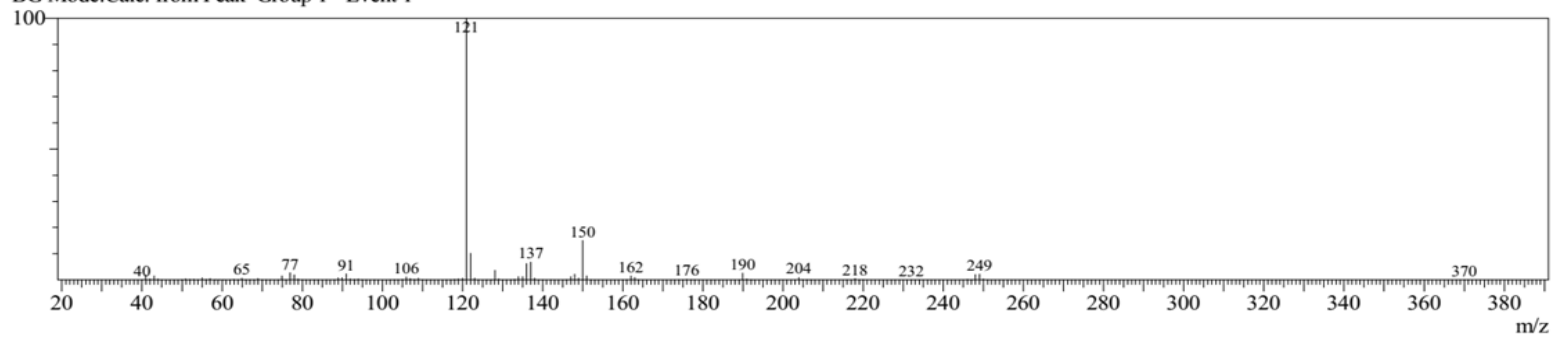
Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	15.790	15.533	16.525	33873243	100.00	9532192	100.00	3.55	MI	
				33873243	100.00	9532192	100.00			

Line#:1 R.Time:15.792(Scan#:1416)

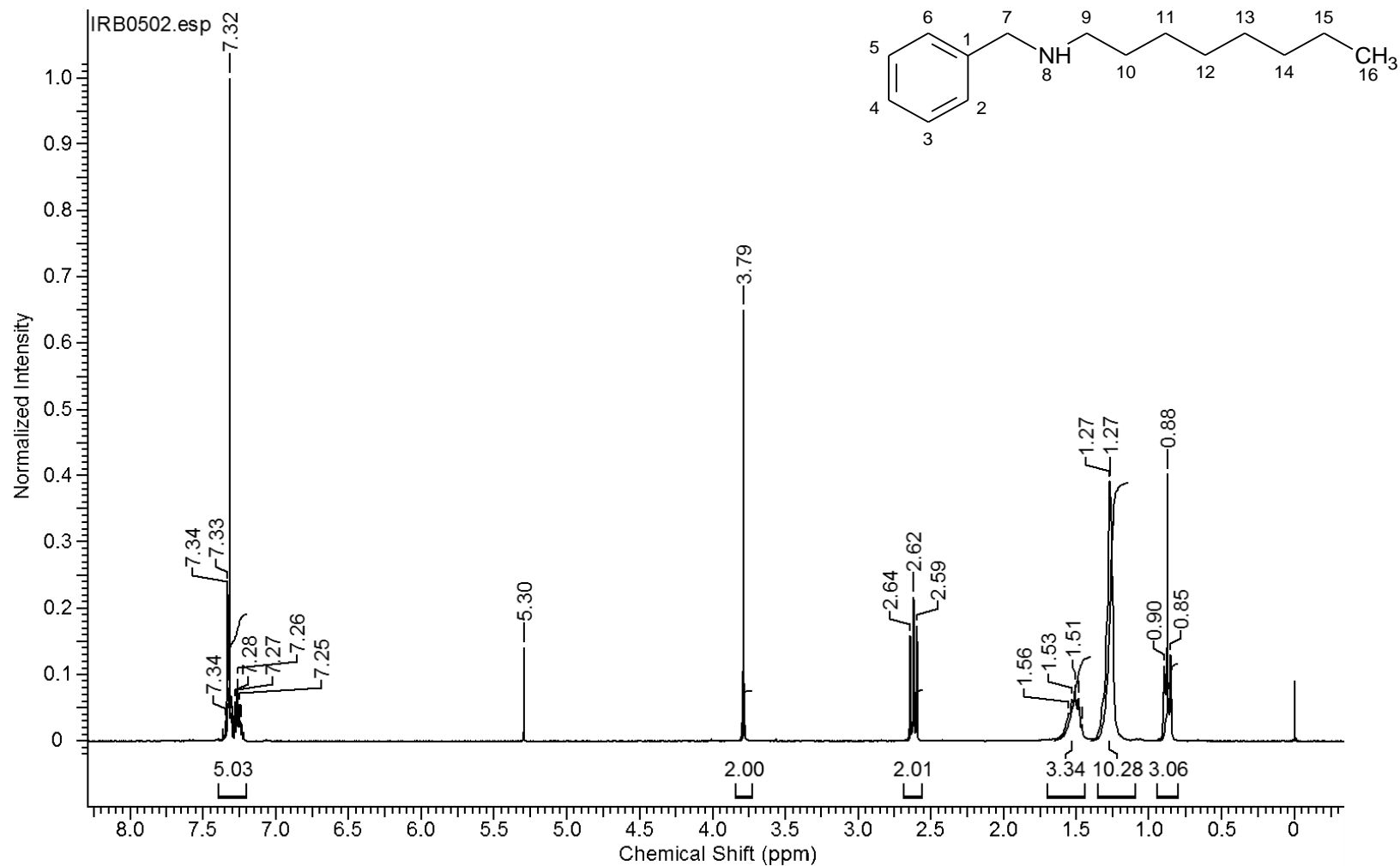
MassPeaks:125

RawMode:Averaged 15.783-15.800(1415-1417) BasePeak:121(4651931)

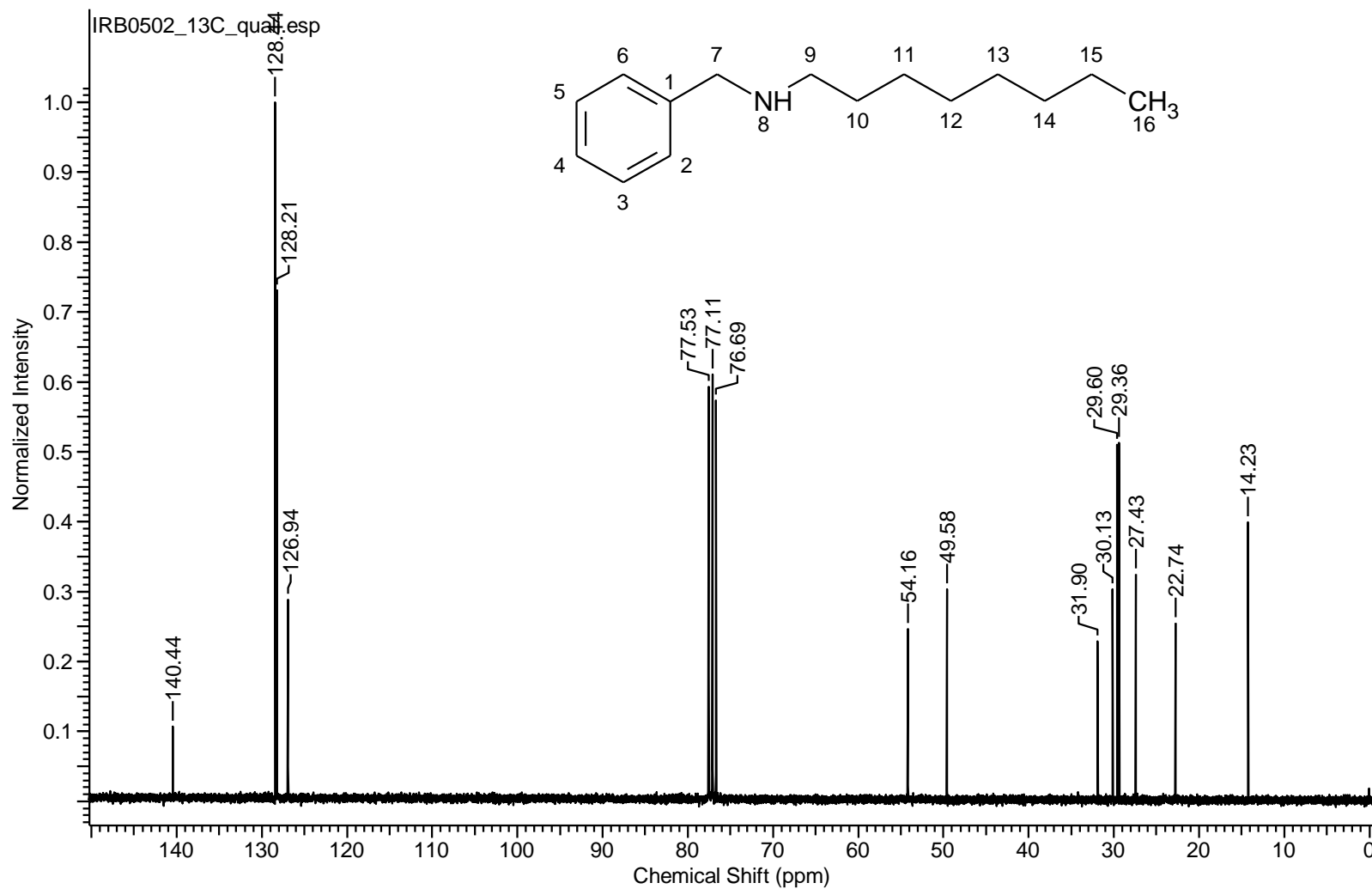
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



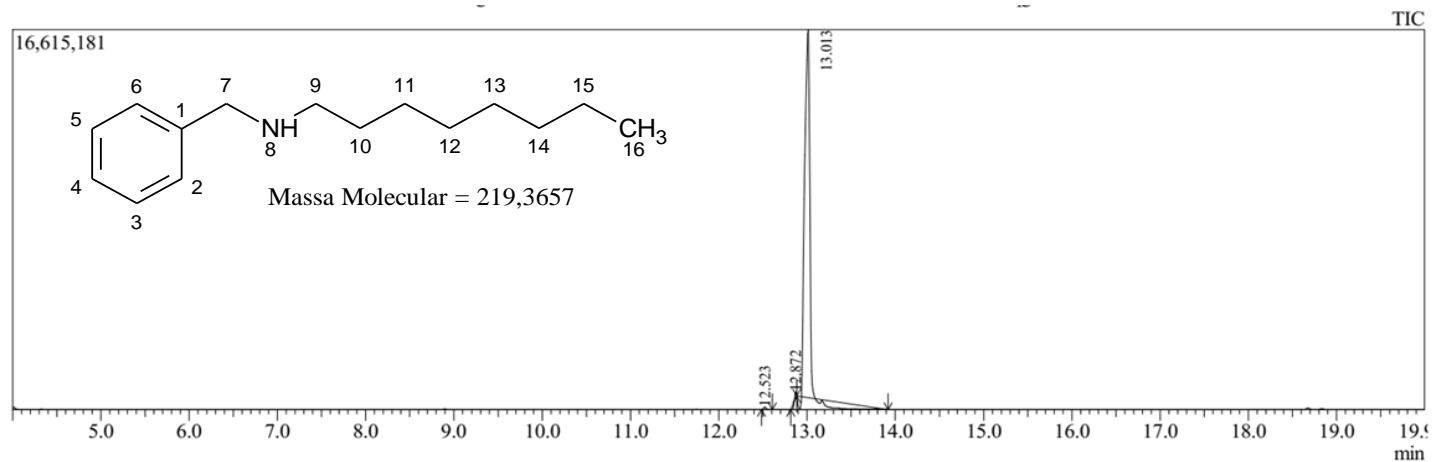
Apêndice 9: CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 15,79 min; 249 [M]⁺ (5), 190 (5), 150 (15), 137 (10), 121 (100), 77 (5).



Apêndice 10: ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-16); 1,17-1,38 (m, 10H, H-11/12/13/14/15); 1,44-1,61 (m, 3H, H-8/10); 2,62 (t, J = 7,2 Hz, 2H, H-9); 3,79 (s, 2H, H-7); 7,20-7,38 (m, 5H, H-2/3/4/5/6).



Apêndice11: ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 14,2 (C-16); 22,7 (C-15); 27,4 (C-11); 29,4 (C-12); 29,6 (C-13); 30,1 (C-10); 31,9 (C-14); 49,6 (C-7); 54,2 (C-9); 126,9 (C-4); 128,2 (C-3/5); 128,4 (C-2/6); 140,4 (C-1).



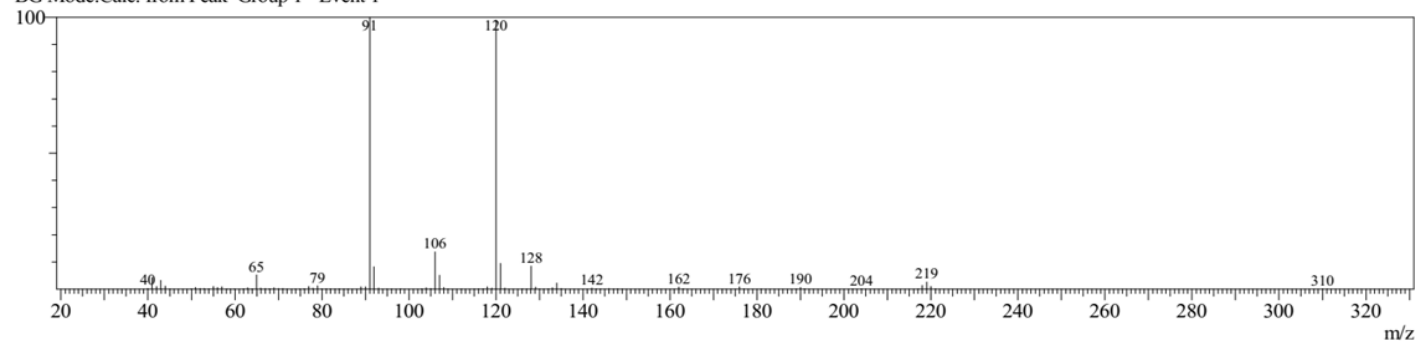
Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	12.523	12.483	12.608	230129	0.41	118054	0.72	1.95	MI	
2	12.872	12.817	12.883	248974	0.45	274889	1.67	0.91	MI	
3	13.013	12.883	13.917	55044052	99.14	16080235	97.61	3.42	MI	
				55523155	100.00	16473178	100.00			

Line#:3 R.Time:13.017(Scan#:1083)

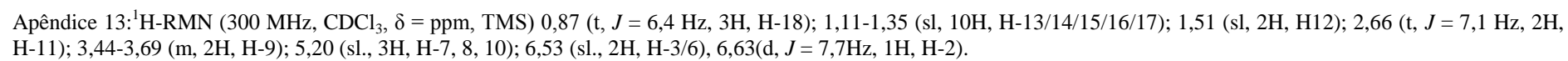
MassPeaks:100

RawMode:Averaged 13.008-13.025(1082-1084) BasePeak:91(5278125)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

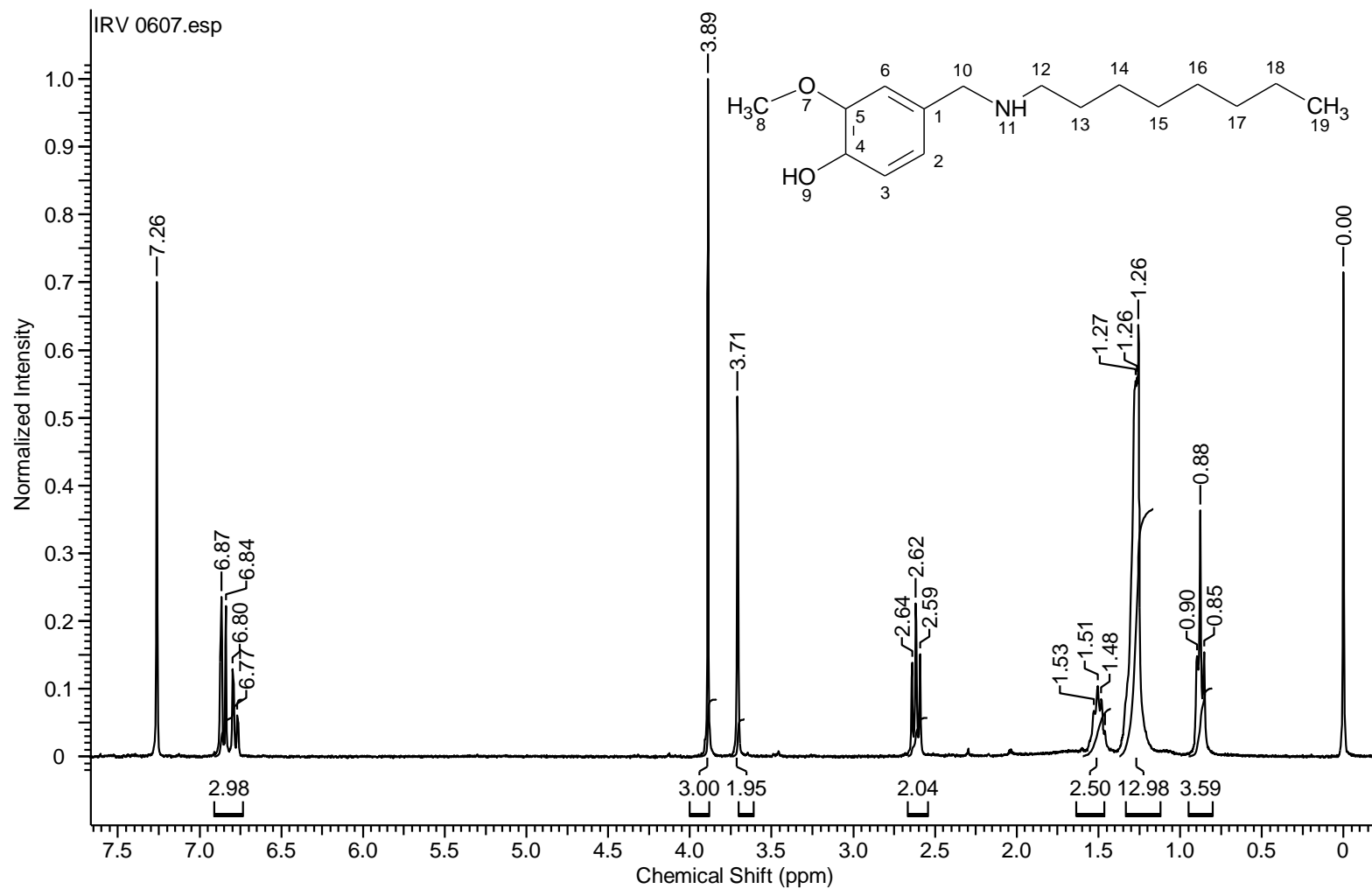


Apêndice 12CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 13,01 min; 219 [M]⁺ (3), 128 (9), 120 (98), 106 (15), 91 (100).:

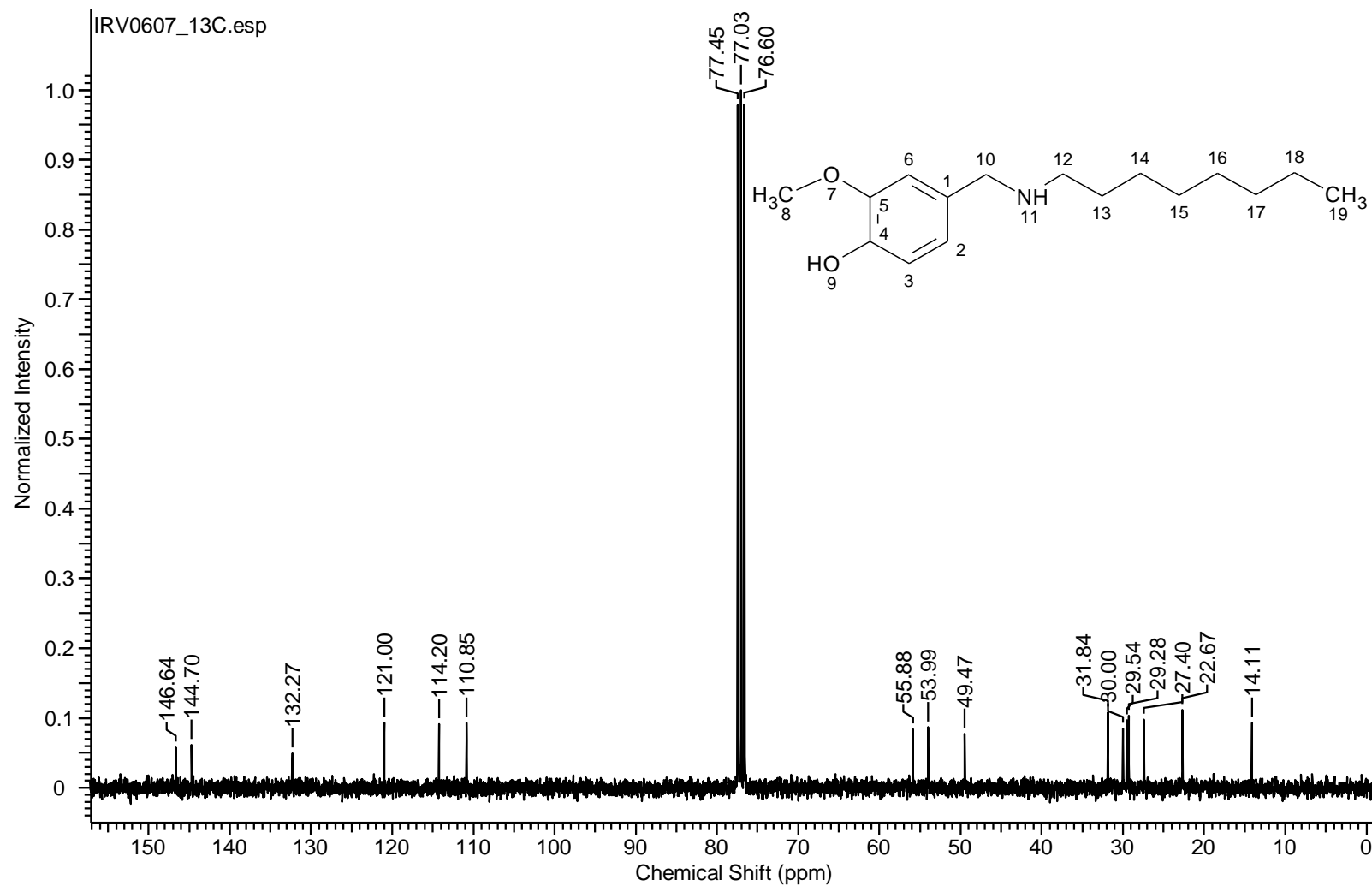




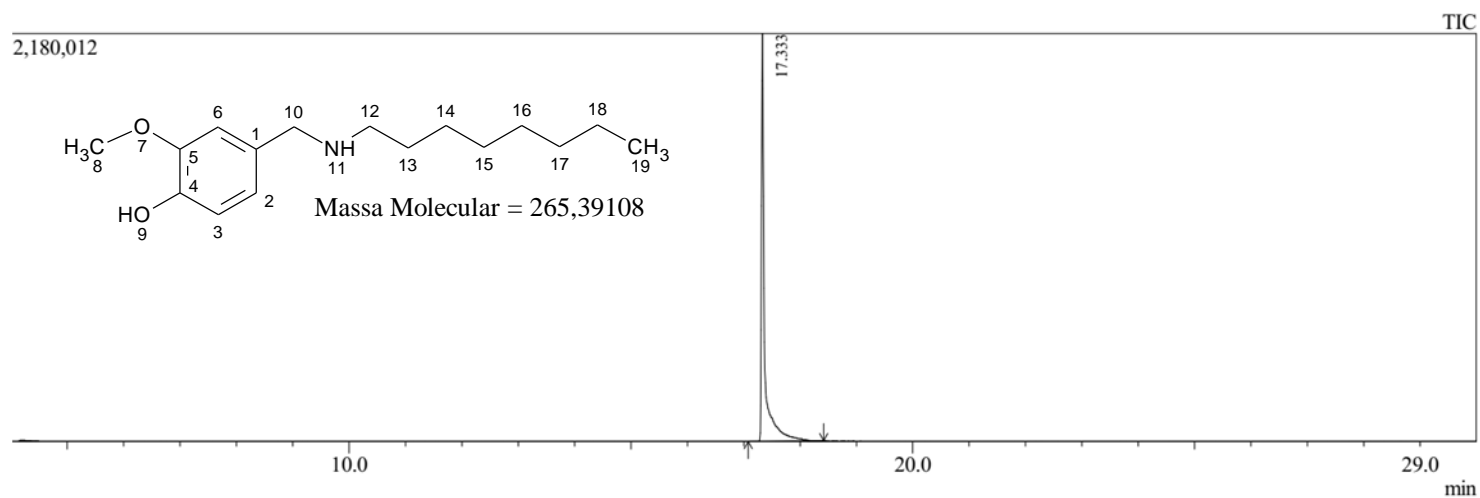
Apêndice14: ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO, δ = ppm, TMS) 14,4 (C-18); 22,6 (C-17); 27,3 (C-13); 29,2 (C-14) 29,4 (C-15); 29,8 (C-12); 31,8 (C-16); 48,9 (C-11); 53,2 (C-9); 115,6 (C-6); 115,9 (C-3); 119,2 (C-2); 131,9 (C-1); 144,4 (C-5); 145,4 (C-4).



Apêndice 15: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,87 (t, J = 6,6 Hz, 3H, H-19); 1,16-1,37 (m, 10H, H-14/15/16/17/18); 1,42-1,50 (m, 2H, H13); 2,62 (t, J = 7,2 Hz, 2H, H-12); 3,71 (s, 2H, H-10); 3,89 (s, 3H, H-8); 6,73-6,91 (m, 3H, H-2/3/6).



Apêndice 16: ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 14,1 (C-19); 22,7 (C-18); 27,4 (C-14); 29,3 (C-15); 29,5 (C-16); 30,0 (C-13); 31,8 (C-17); 49,5 (C-12); 53,9 (C-10); 55,9 (C-8); 110,9 (C-6); 114,2 (C-3); 121,0 (C-2); 132,3 (C-1); 144,7 (C-5); 146,7 (C-4).



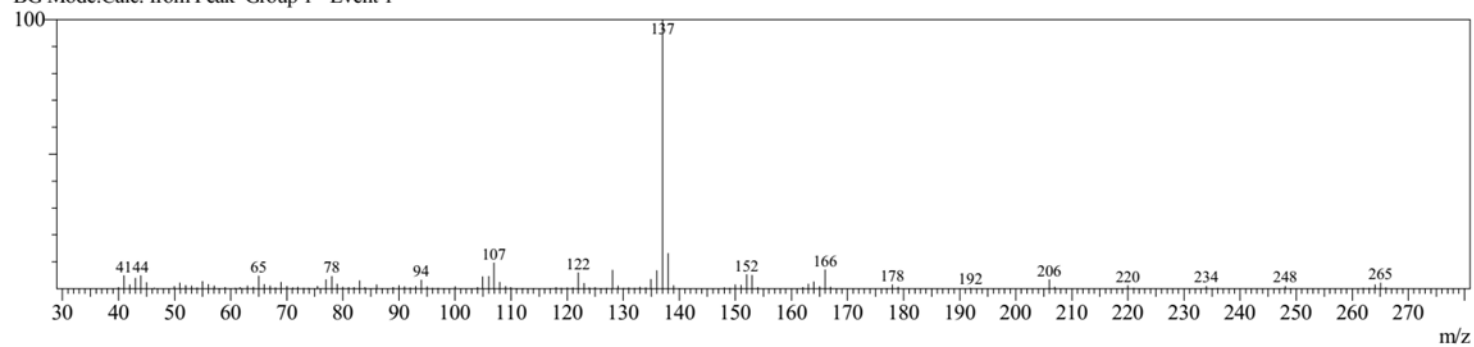
Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	17.333	17.083	18.417	8324543	100.00	2179204	100.00	3.82	MI	
				8324543	100.00	2179204	100.00			

Line#:1 R.Time:17.333(Scan#:1601)

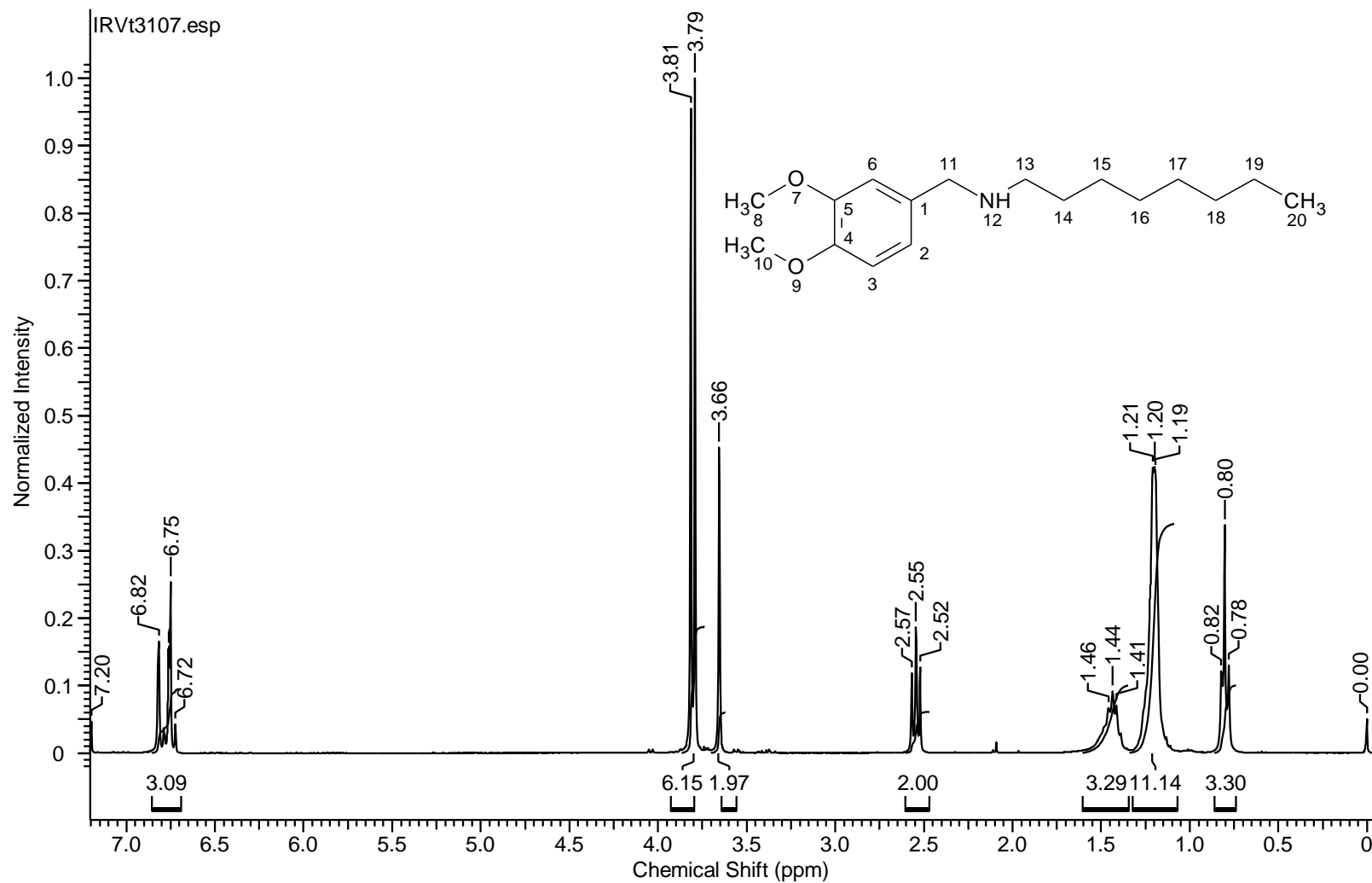
MassPeaks:118

RawMode:Averaged 17.325-17.342(1600-1602) BasePeak:137(699069)

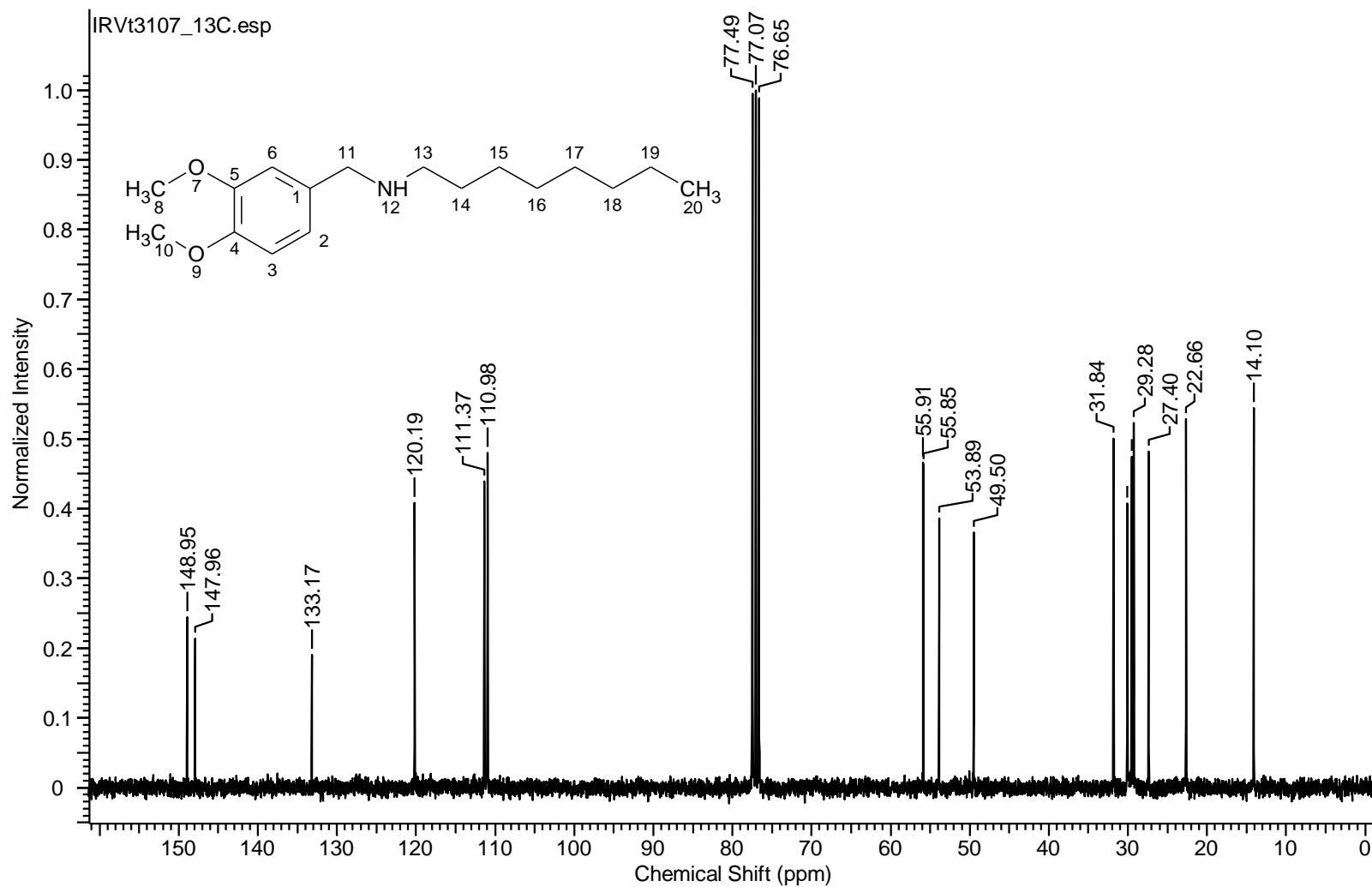
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



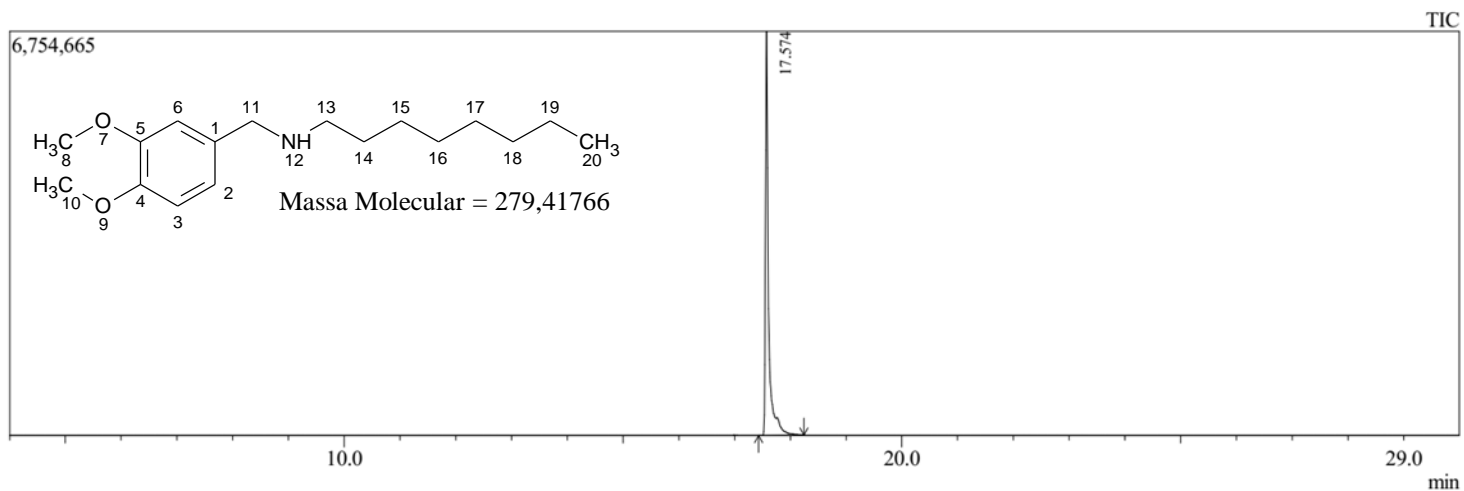
Apêndice 17:CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 17,33 min. 265 [M]⁺ (3), 206 (7), 166 (10), 152 (9), 137 (100), 122 (7), 107 (10).



Apêndice 18: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,87 (t, J = 6,6 Hz, 3H, H-19); 1,16-1,37 (m, 10H, H-14/15/16/17/18); 1,42-1,50 (m, 2H, H13); 2,62 (t, J = 7,2 Hz, 2H, H-12); 3,71 (s, 2H, H-10); 3,89 (s, 3H, H-8); 6,73-6,91 (m, 3H, H-2/3/6).

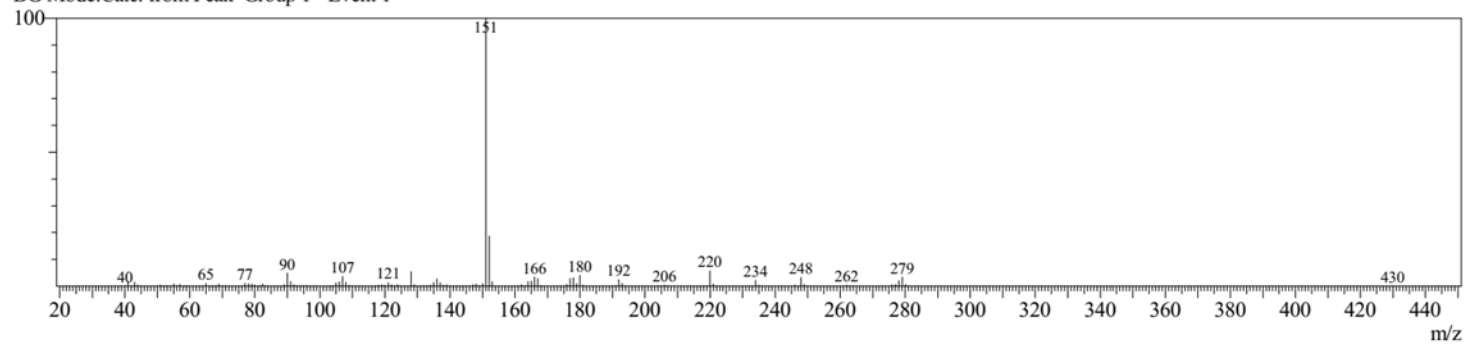


Apêndice 19: ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 14,1 (C-20); 22,7 (C-19); 27,4 (C-15); 29,3 (C-16); 29,5 (C-17); 30,1 (C-14); 31,8 (C-18); 49,5 (C-13); 53,9 (C-11); 55,8 (C-8); 55,9 (C-10); 110,9 (C-3); 111,2 (C-6); 120,2 (C-2); 133,2 (C-1); 147,9 (C-4); 148,9 (C-5).

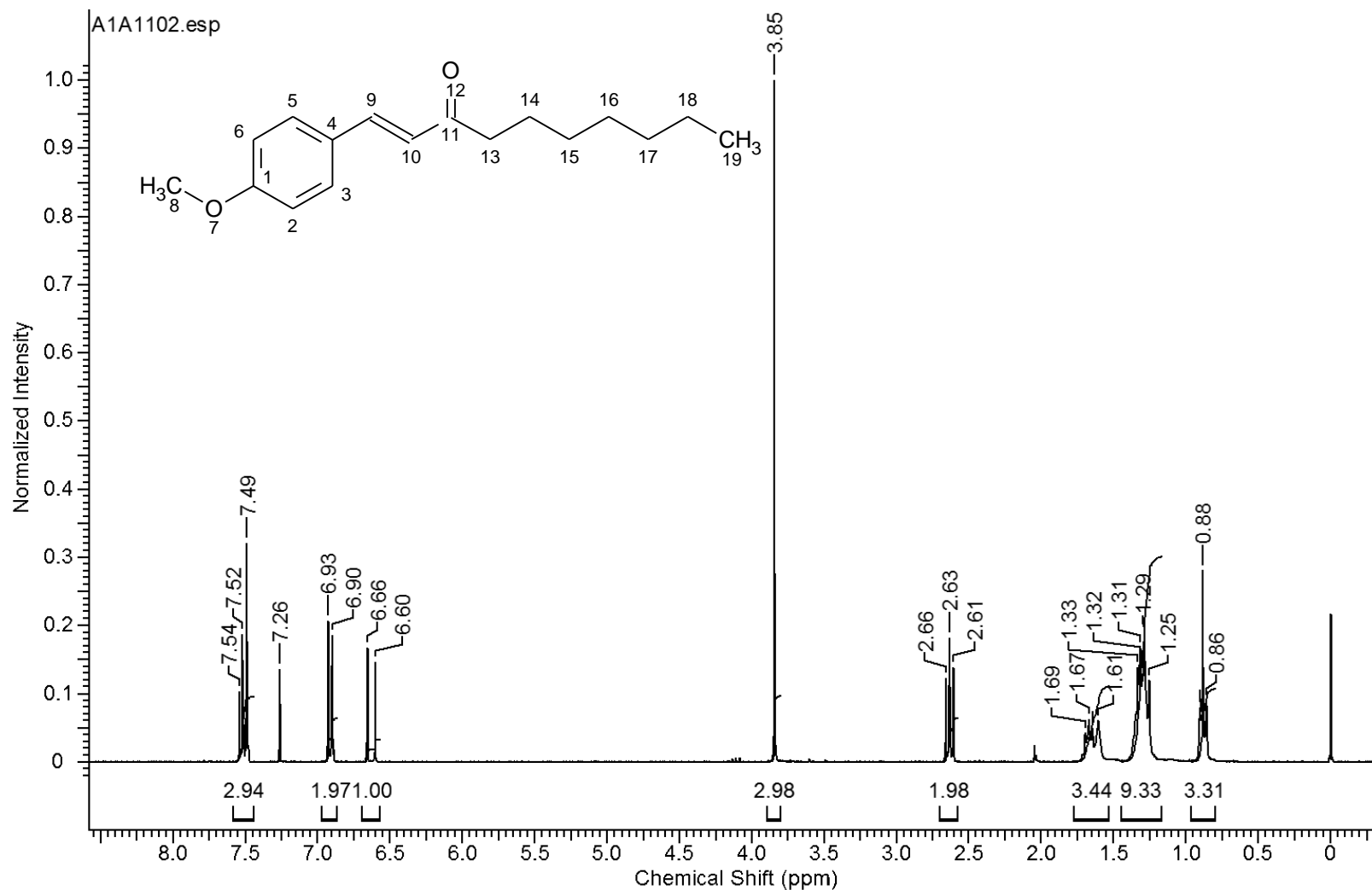


Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	17.574	17.433	18.242	26037235	100.00	6753565	100.00	3.86	MI	
				26037235	100.00	6753565	100.00			

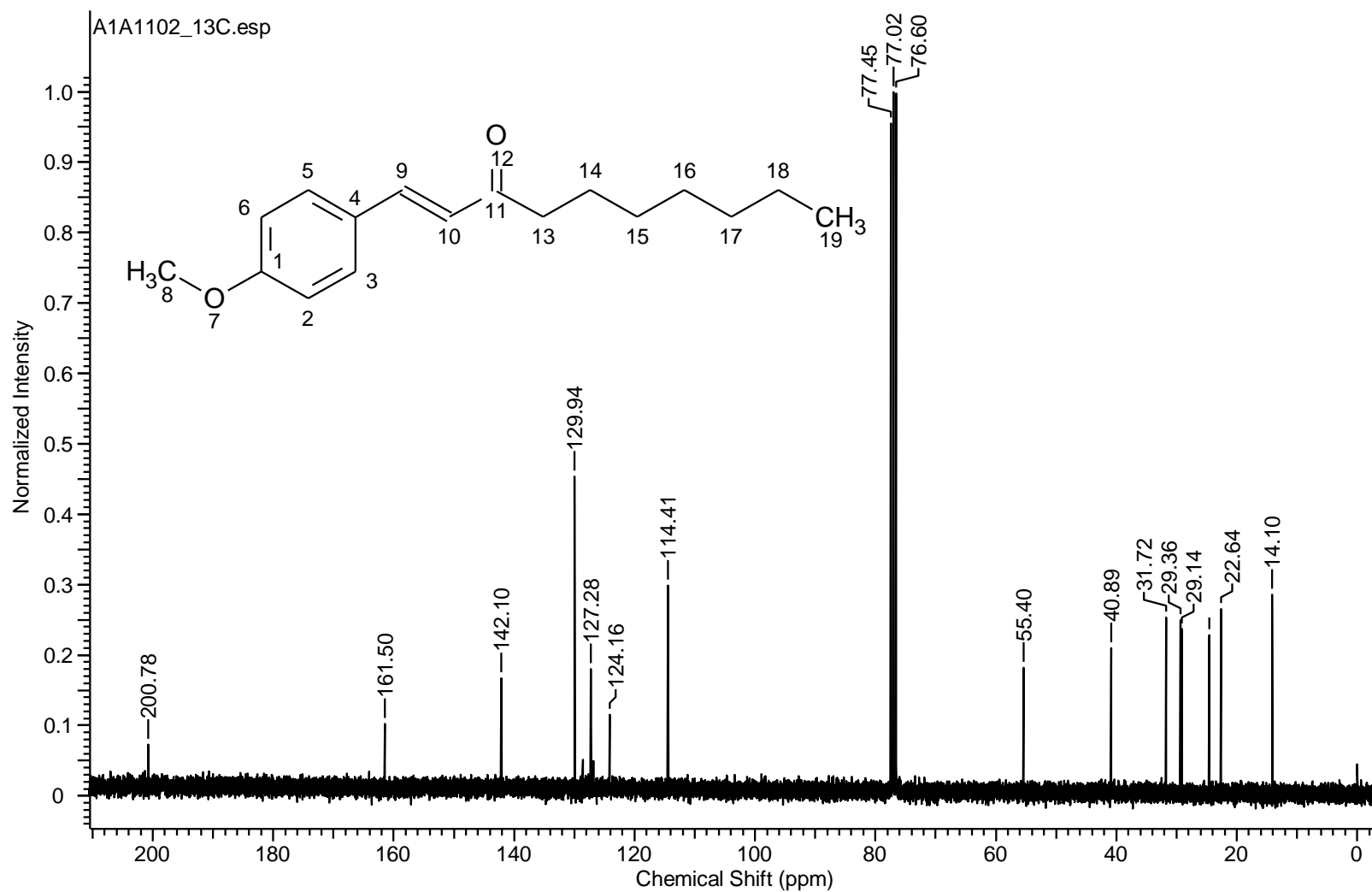
Line#:1 R.Time:17.575(Scan#:1630)
 MassPeaks:147
 RawMode:Averaged 17.567-17.583(1629-1631) BasePeak:151(2818726)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



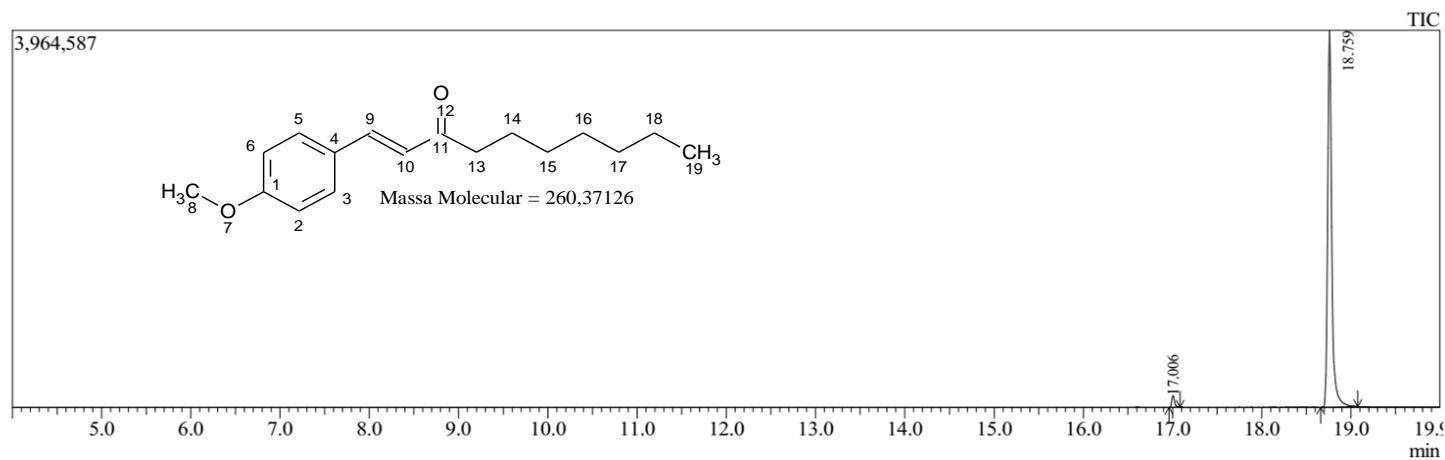
Apêndice20:CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de 17,57 min; 279 [M]⁺ (5), 248 (5), 220 (10), 180 (7), 151 (100), 107 (5), 90 (7).



Apêndice21: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-19); 1,20-1,40 (m, 8H, H-15/16/17/18); 1,56-1,63 (m, 2H, H-14); 2,63 (t, J = 7,4 Hz, 2H, H-13); 3,85 (s, 3H, H-8); 6,63 (d, J = 16,3 Hz, 1H, H-10); 6,90-6,93 (m, 2H, H-2/6); 7,49-7,54 (m, 3H, H-3/5/9).



Apêndice22: ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 14,1 (C-19); 22,7 (C-18); 24,6 (C-14); 29,1 (C-15); 29,4 (C-16); 31,7 (C-17); 40,9 (C-13); 55,4 (C-8); 114,4 (C-2/6); 124,2 (C-10); 127,3 (C-4); 129,9 (C-3/5); 142,1 (C-9); 161,5 (C-1); 200,8 (C-11).



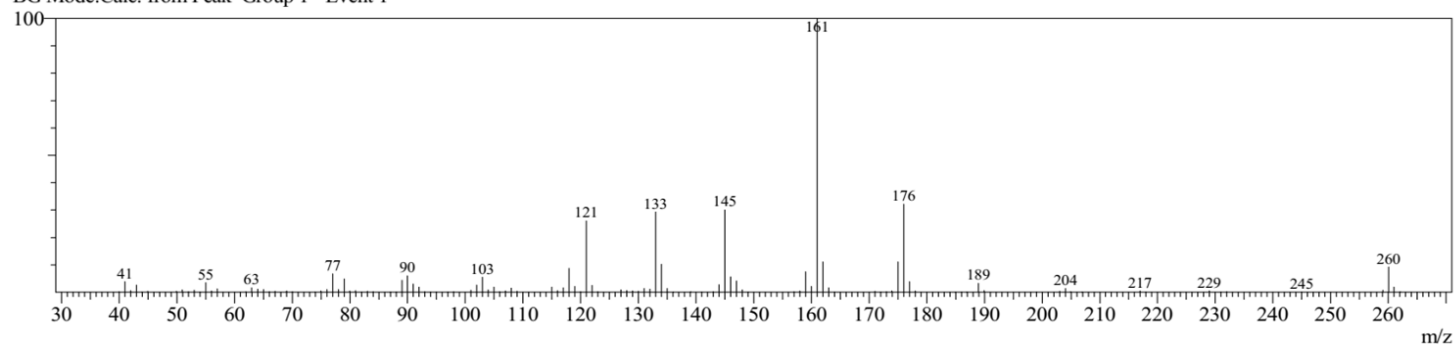
Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	17.006	16.958	17.083	270864	2.06	121285	2.97	2.23	MI	
2	18.759	18.658	19.075	12898147	97.94	3959154	97.03	3.26	MI	
				13169011	100.00	4080439	100.00			

Line#:2 R.Time:18.758(Scan#:1772)

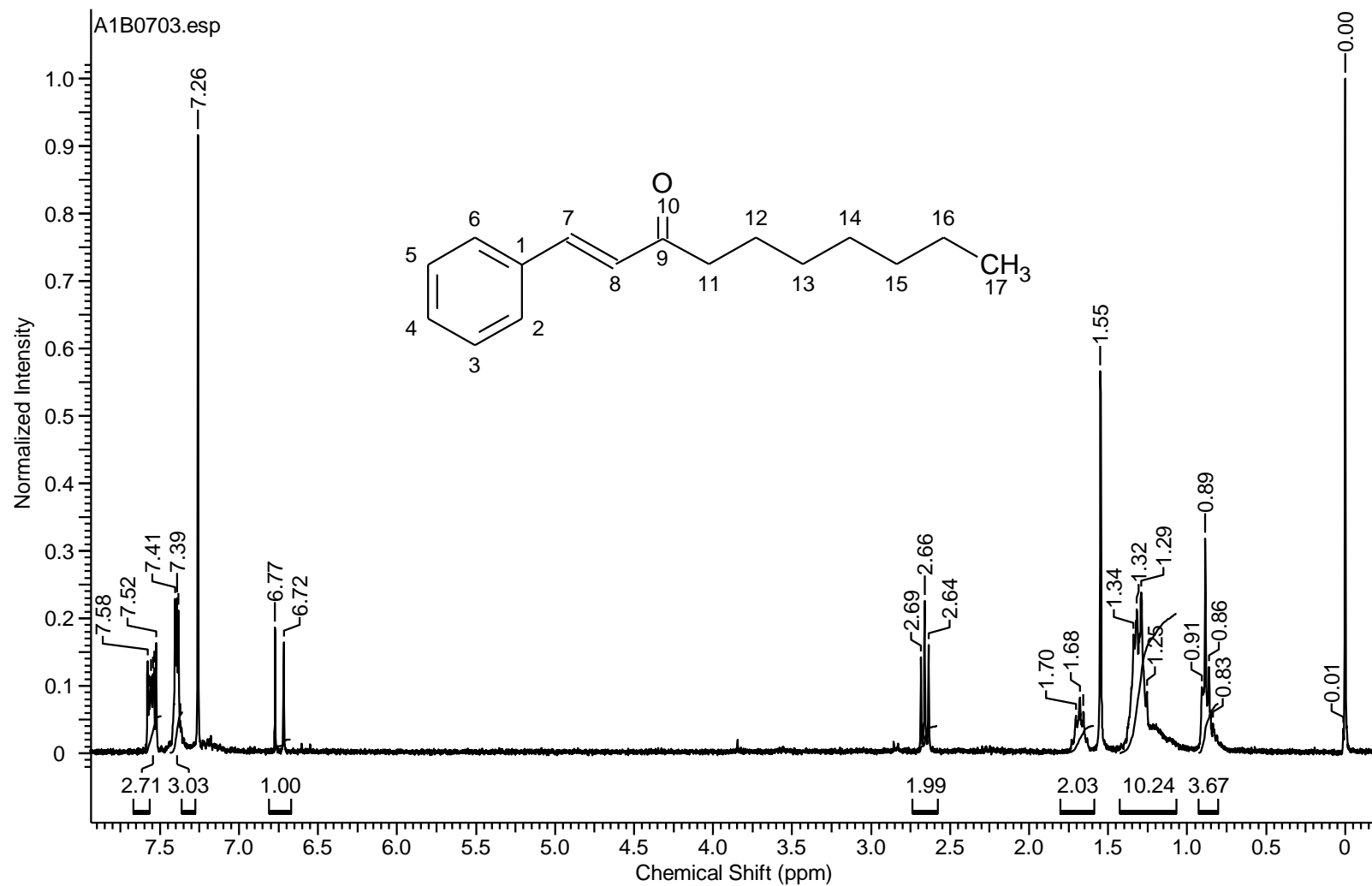
MassPeaks:117

RawMode:Averaged 18.750-18.767(1771-1773) BasePeak:161(947857)

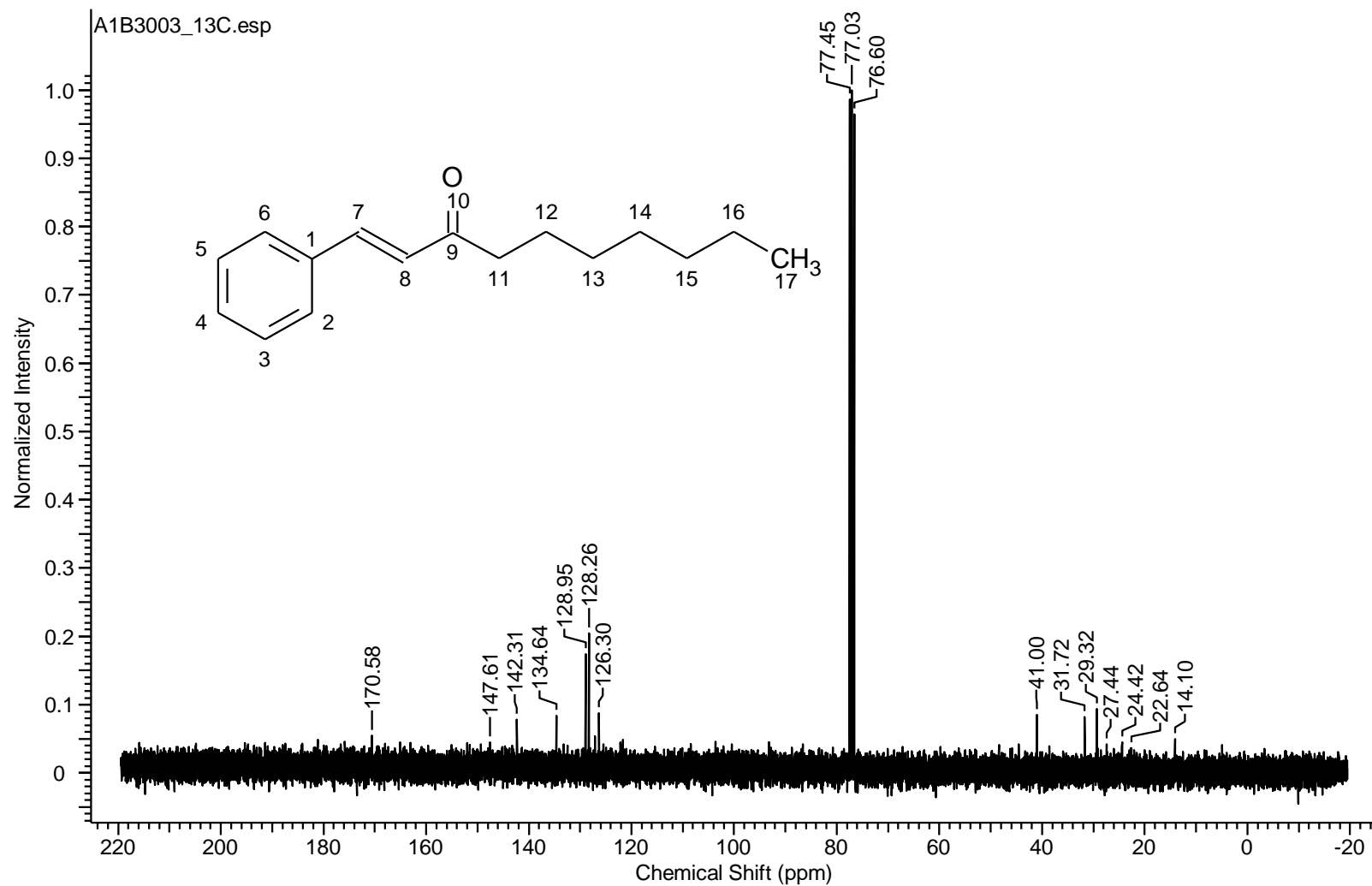
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



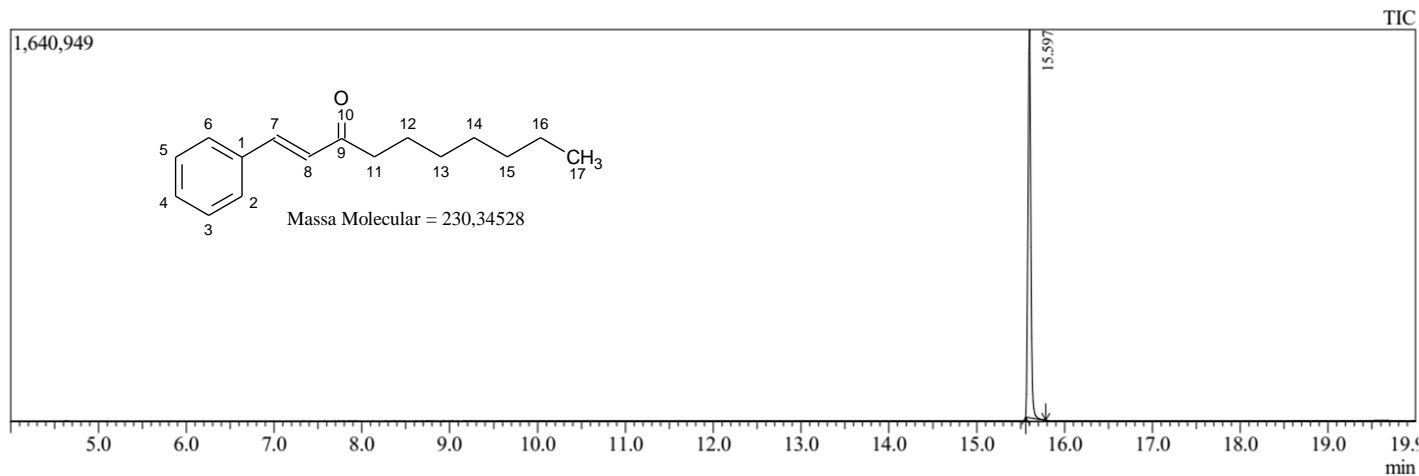
Apêndice 23:CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 18,76 min; 260 [M]⁺ (10), 176 (32), 161 (100), 145 (30), 133 (29), 121 (25).



Apêndice 24: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,87 (m, 3H, H-17); 1,10-1,42 (m, 10H, H-12/13/14/15/16); 1,60-1,71 (m, 2H, H-12); 2,66 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, H-11); 6,75 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H, H-8); 7,36-7,43 (m, 3H, H-3/4/5); 7,50-7,62 (m, 3H, H-2/6/7).



Apêndice 25: ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 14,1 (C-17); 22,64 (C-16); 24,4 (C-12); 27,4 (C-13); 29,3 (C-14); 31,7 (C-15); 41,0 (C-11); 126,30 (C-8); 128,3 (C-2/6); 128,9 (C-3/5); 134,6 (C-4); 142,3 (C-1); 147,6 (C-7); 170,6 (C-9).



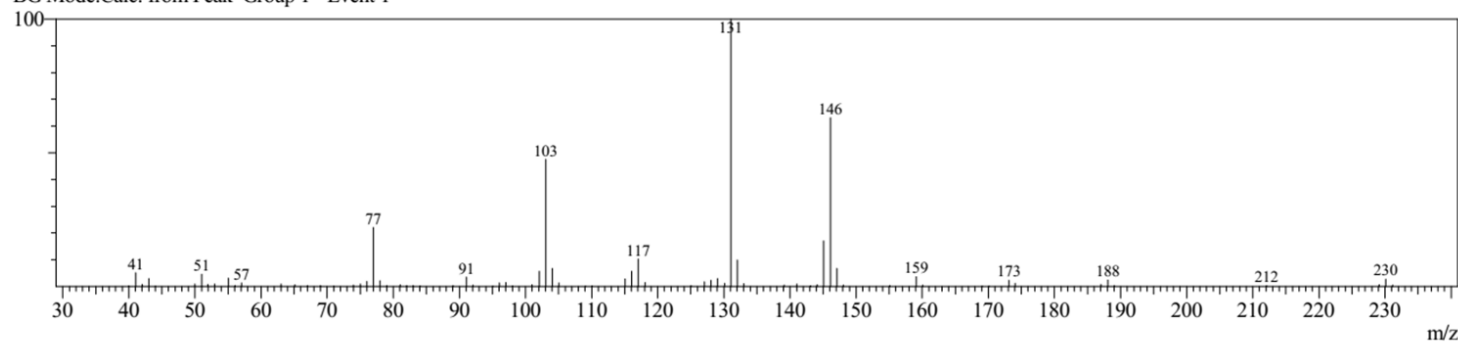
Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	15.597	15.558	15.783	3635758	100.00	1625029	100.00	2.24	MI	
				3635758	100.00	1625029	100.00			

Line#:1 R.Time:15.600(Scan#:1393)

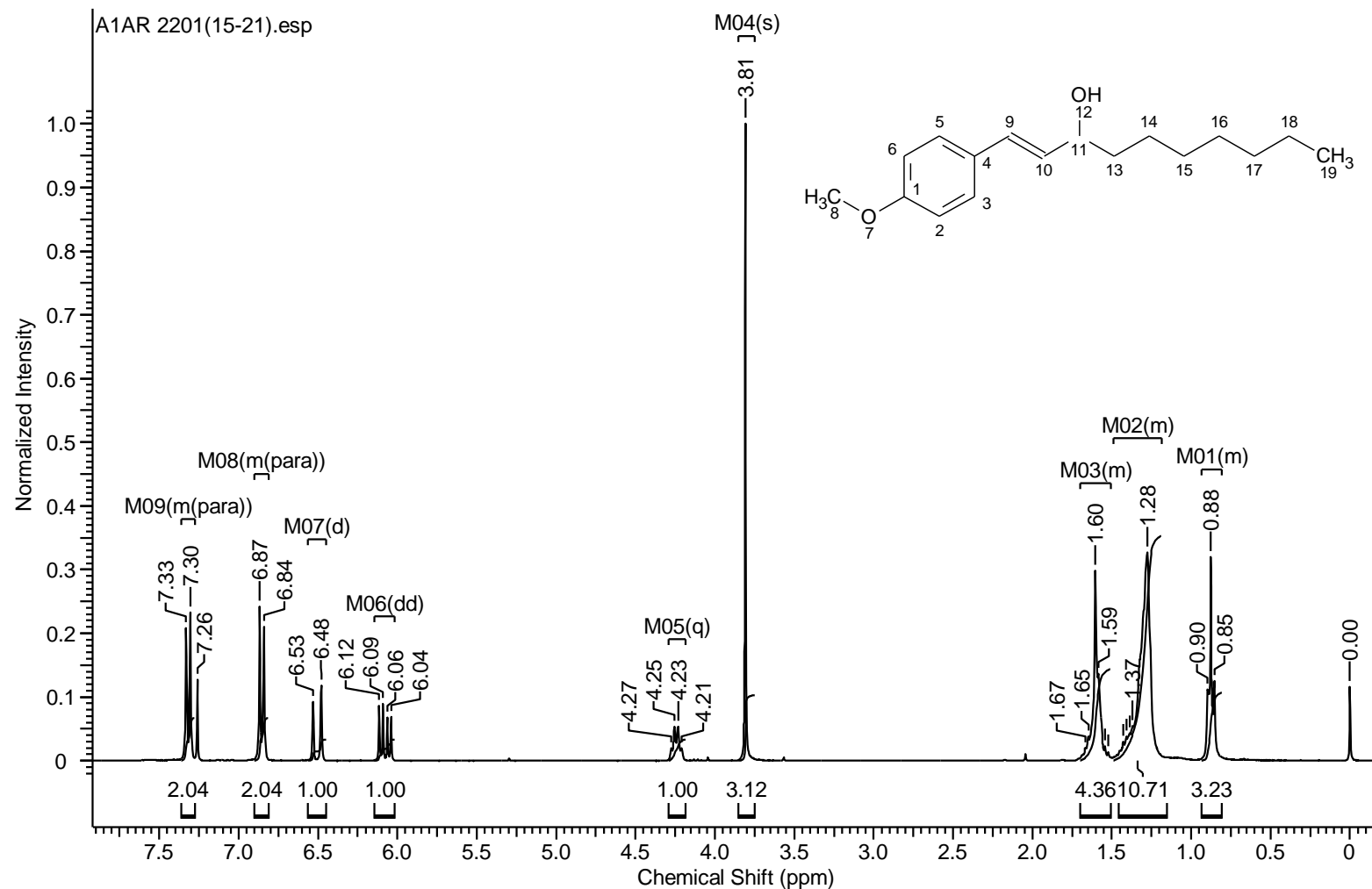
MassPeaks:75

RawMode:Averaged 15.592-15.608(1392-1394) BasePeak:131(395542)

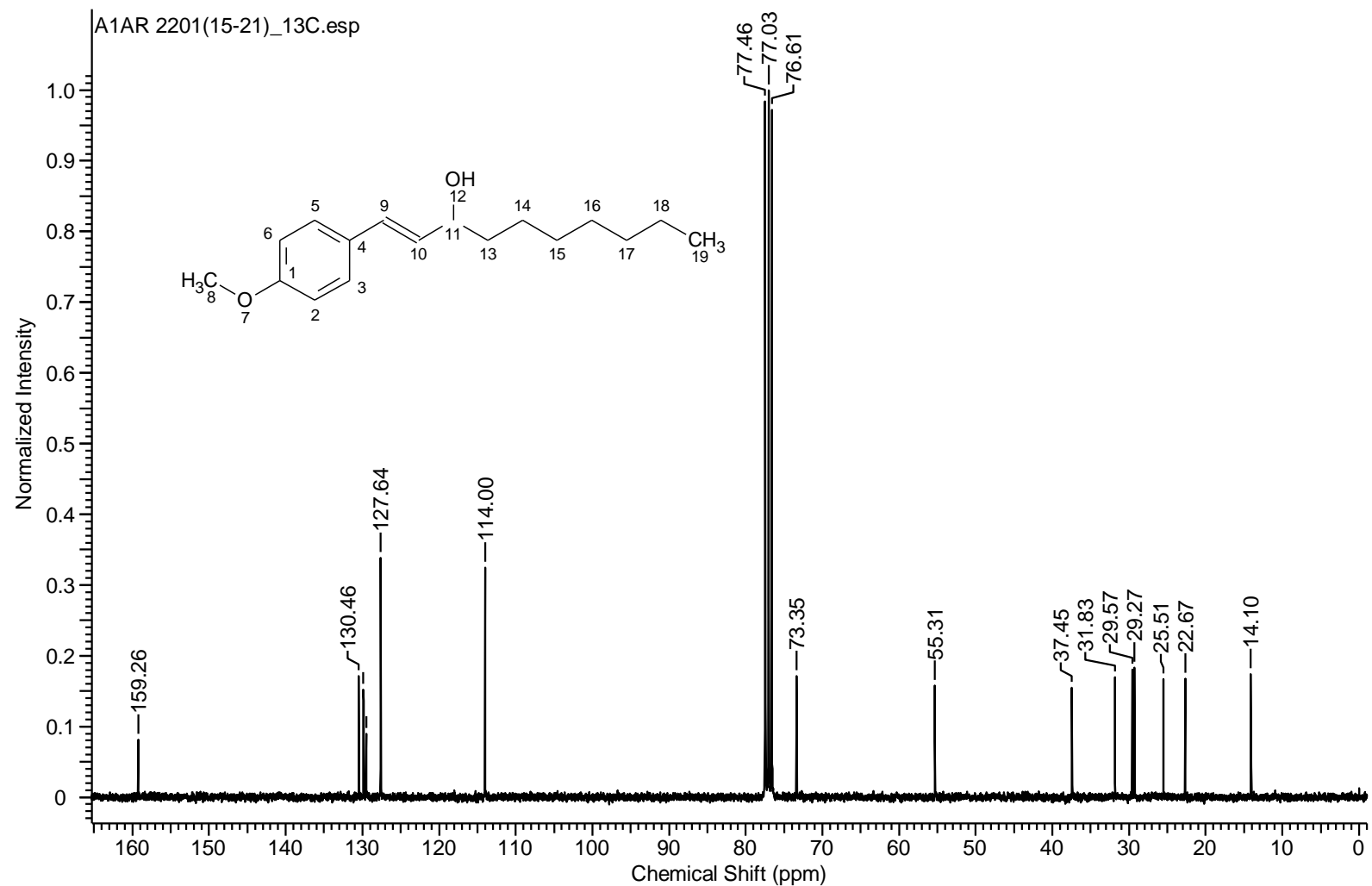
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



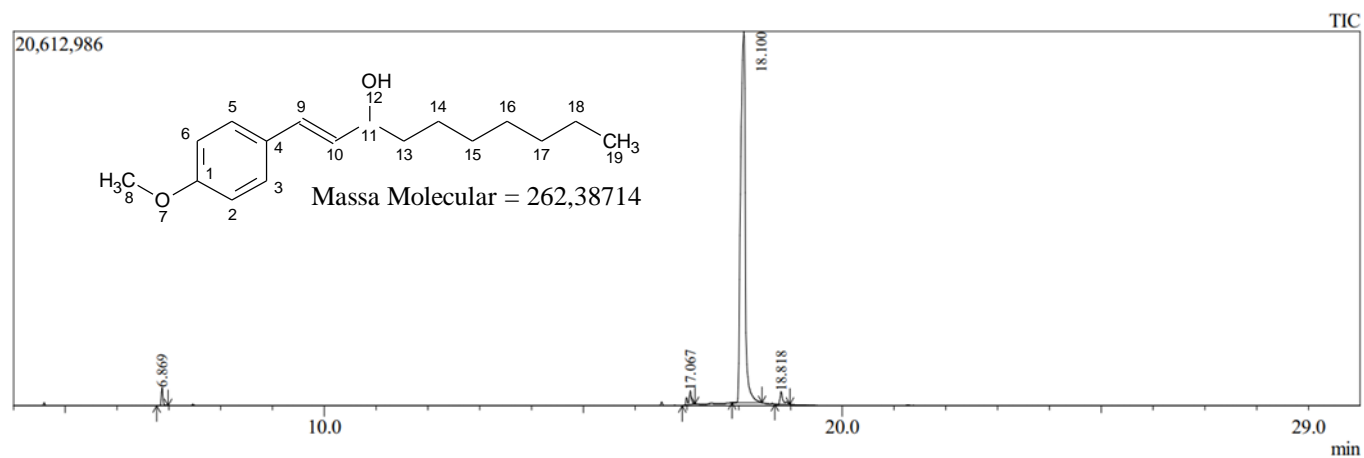
Apêndice 26: CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 15,59 min; 230 [M]⁺ (5), 159 (5), 146 (60), 131 (100), 117 (15), 103 (49), 77 (25).



Apêndice27: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-19); 1,20-1,48 (m, 10H, H-14/15/16/17/18); 1,50-1,68 (m, 2H, H-13); 3,80 (s, 3H, H-8); 4,23 (q, J = 7,1 Hz, 1H, H-11); 6,07 (dd, J = 15,9, 7,1 Hz, 1H, H-10); 6,50 (d, J = 15,9 Hz, 1H, H-9); 6,81-6,88 (m, 2H, H-2/6); 7,28-7,34 (m, 2H, H-3/5).



Apêndice28: ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 14,1 (C-19); 22,7 (C-18); 25,5 (C-14); 29,3 (C-15); 29,6 (C-16); 31,8 (C-17); 37,5 (C-13); 55,3 (C-8); 73,32 (C-11); 114,0 (C-2/6); 127,6 (C-10); 129,5 (C-4); 129,8 (C-3/5); 130,5 (C-9); 159,2 (C-1).



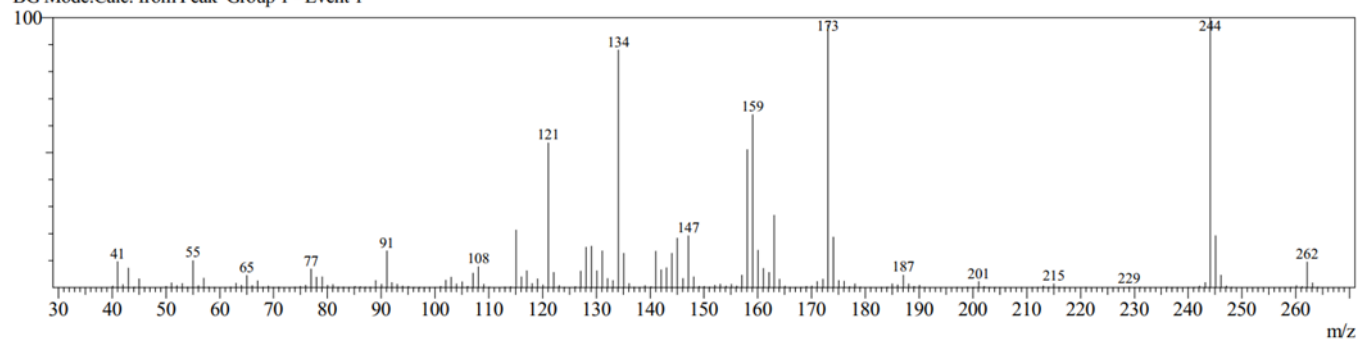
Peak Report TIC									
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark
1	6.869	6.767	6.983	2153020	1.60	1012114	4.42	2.13	MI
2	17.067	16.908	17.158	2889119	2.14	759913	3.32	3.80	MI
3	18.100	17.875	18.450	127165079	94.26	20434598	89.23	6.22	MI
4	18.818	18.700	18.992	2705180	2.01	693914	3.03	3.90	MI
				134912398	100.00	22900539	100.00		

Line#:3 R.Time:18.100(Scan#:1693)

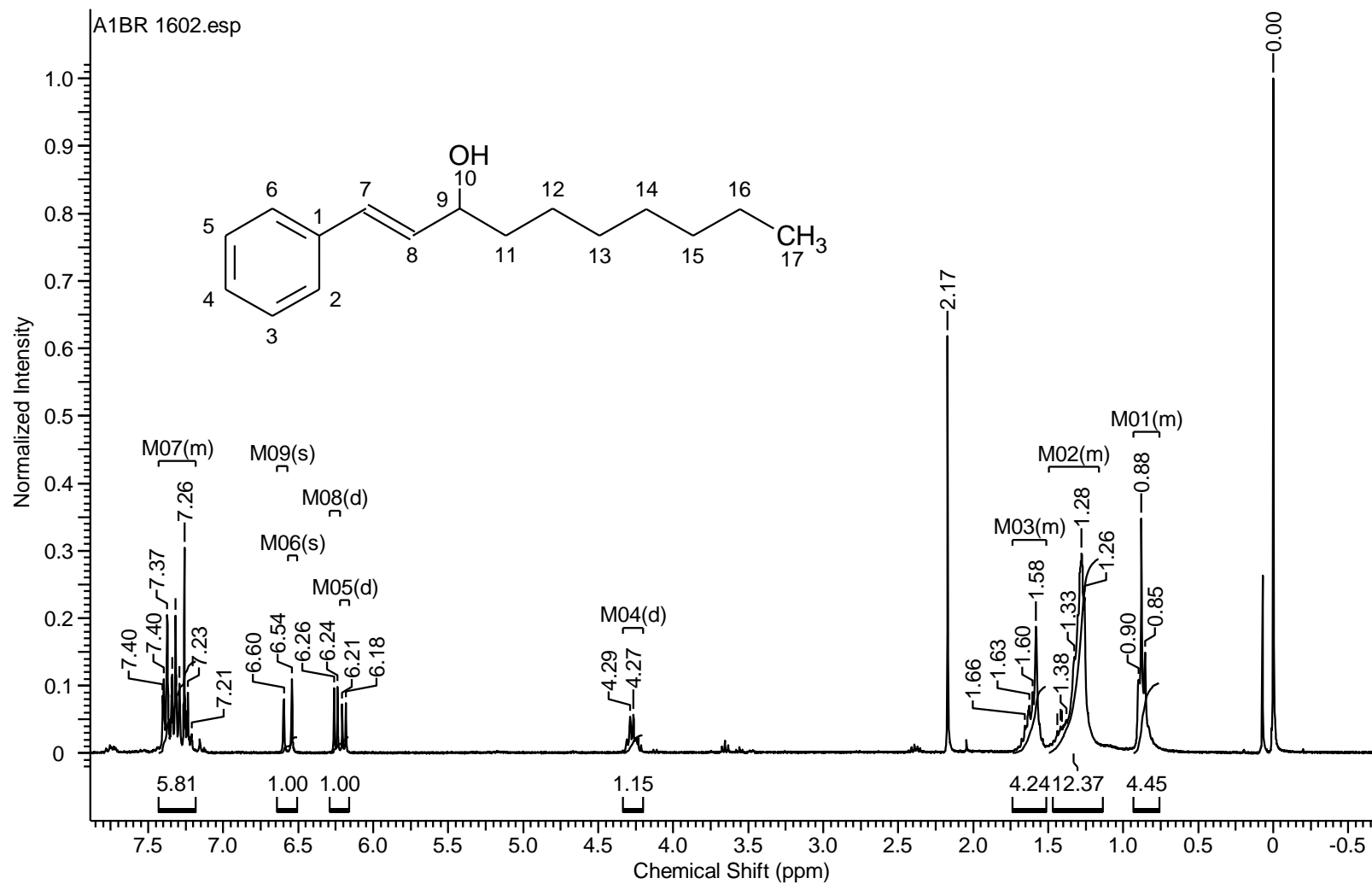
MassPeaks:178

RawMode:Averaged 18.092-18.108(1692-1694) BasePeak:244(2152851)

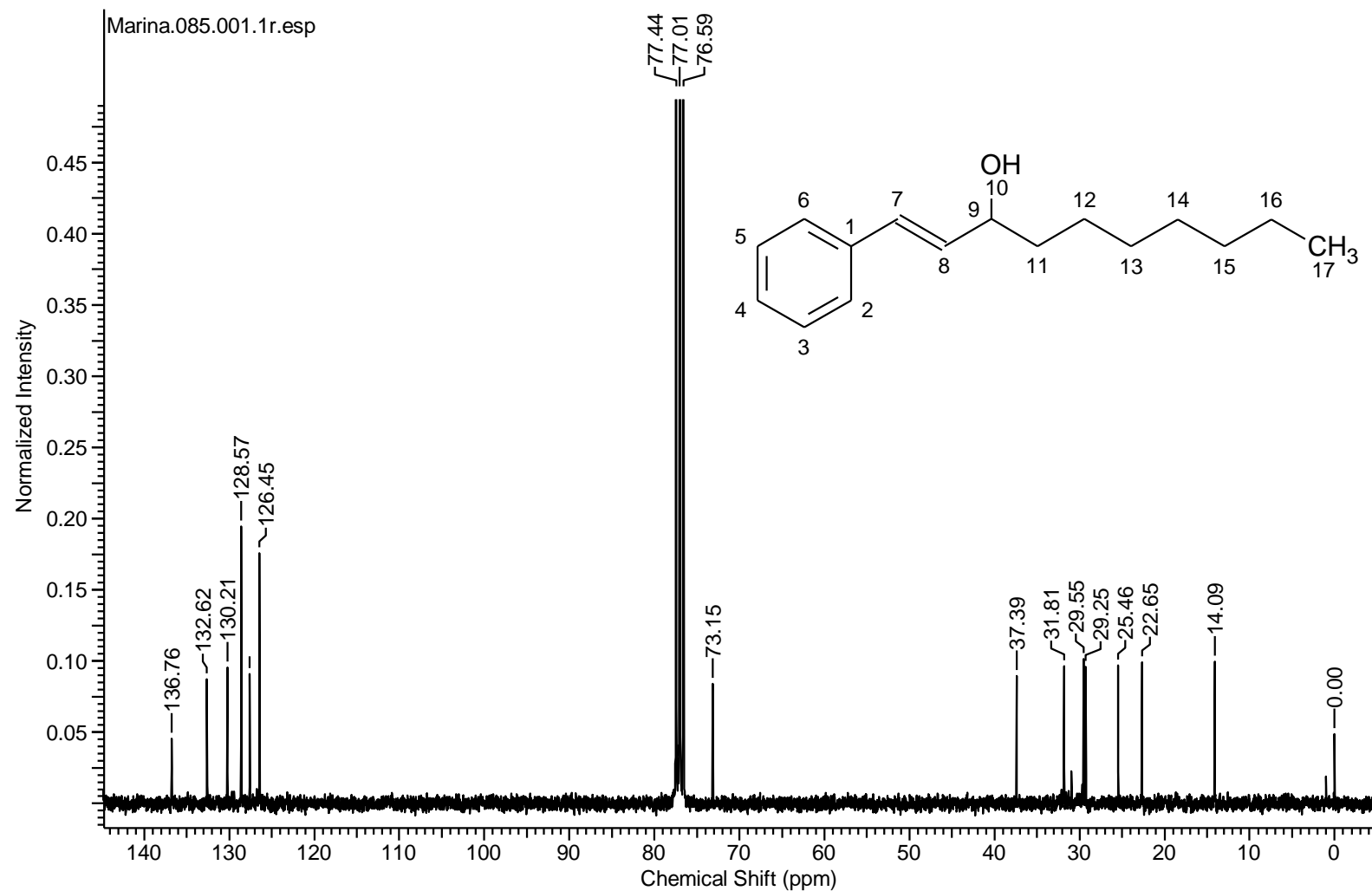
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



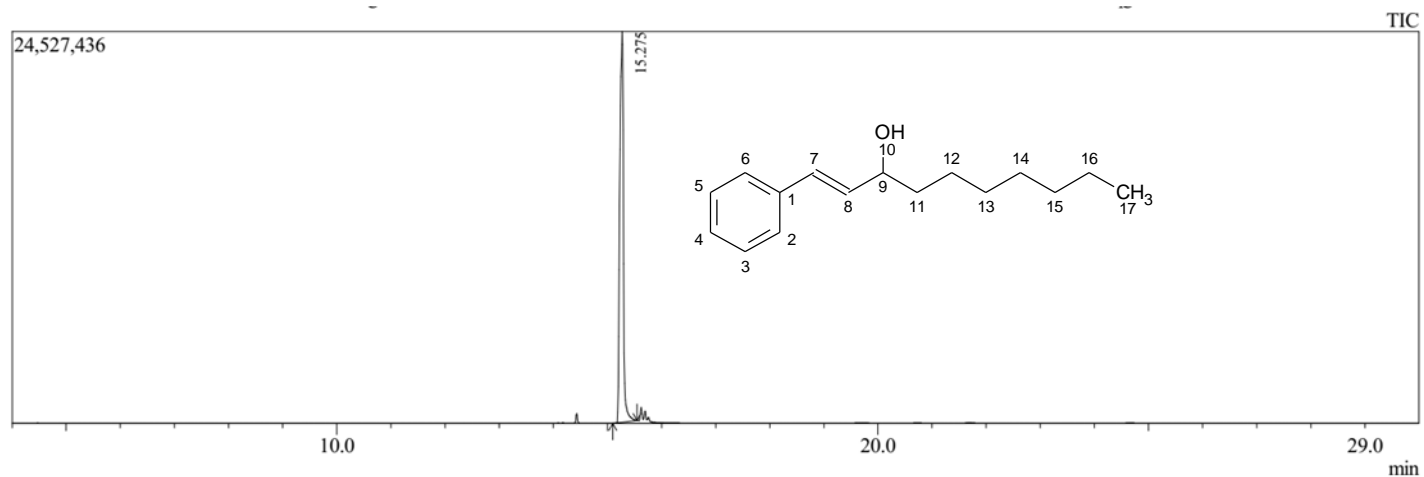
Apêndice 29: CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 18,10 min; 262 [M]⁺ (10), 246 (10), 173 (8), 163 (12), 147 (45), 134 (30), 121 (100), 108(10), 91 (15). 77 (10).



Apêndice 30: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-17); 1,15-1,49 (m, 10H, H-12/13/14/15/16); 1,51-1,72 (m, 2H, H-11); 4,19-4,34 (m, 1H, H-9); 6,25 (dd, J = 15,9, 7,1 Hz, 1H, H-8); 6,57 (d, J = 15,9 Hz, 1H, H-7); 7,17-7,44 (m, 5H, H-2/3/4/5/6).



Apêndice 31: ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 14,1 (C-17); 22,6 (C-16); 25,5 (C-12); 29,3 (C-14); 29,6 (C-13); 31,8 (C-15); 37,4 (C-11); 73,1 (C-9); 126,5 (C-2/6); 127,6 (C-3/5); 128,6 (C-4); 130,2 (C-8); 132,6 (C-7); 136,8 (C-1).



Peak Report TIC

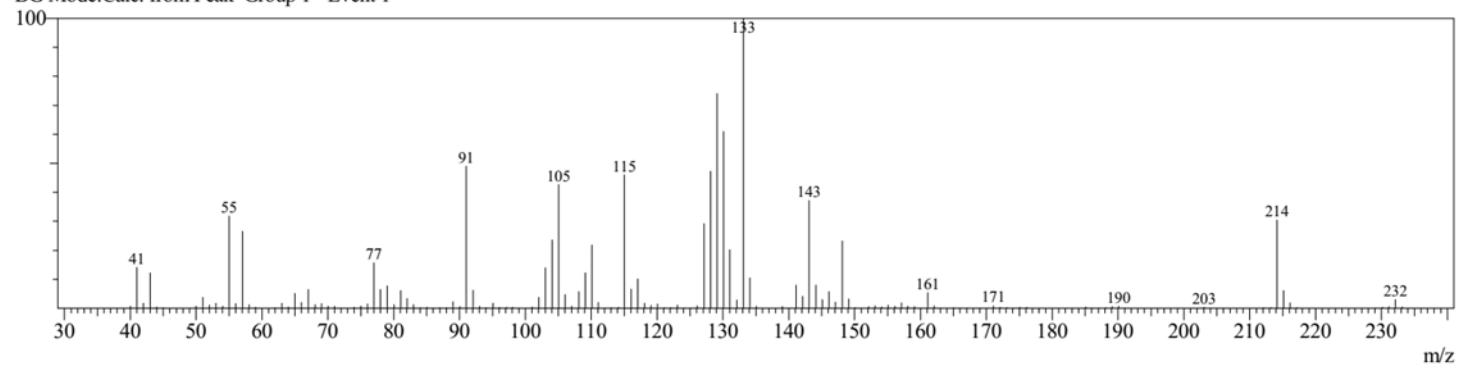
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	15.275	15.100	15.550	115144113	100.00	24450941	100.00	4.71	MI	
				115144113	100.00	24450941	100.00			

Line#:1 R.Time:15.275(Scan#:1354)

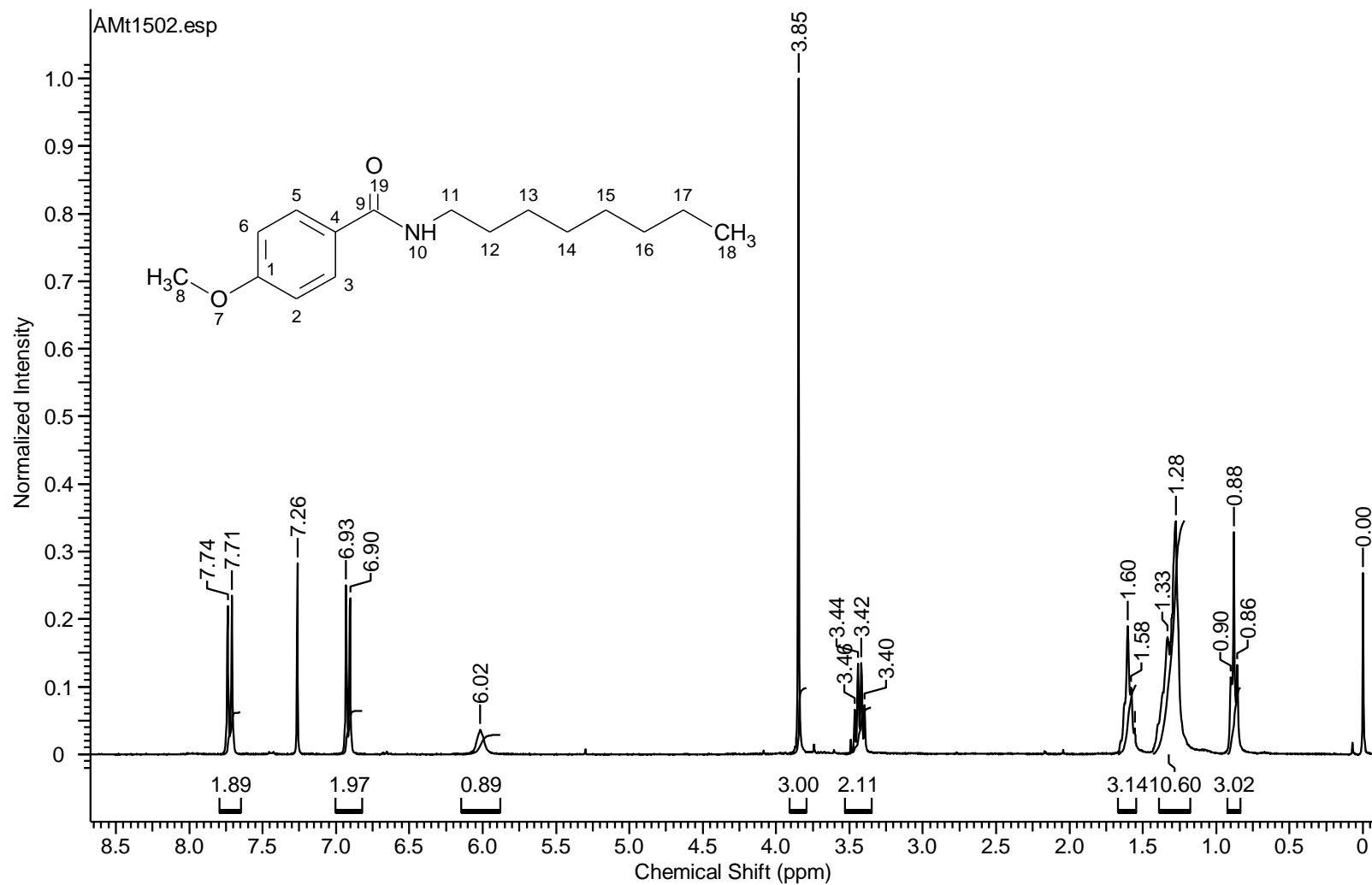
MassPeaks:157

RawMode:Averaged 15.267-15.283(1353-1355) BasePeak:133(2558024)

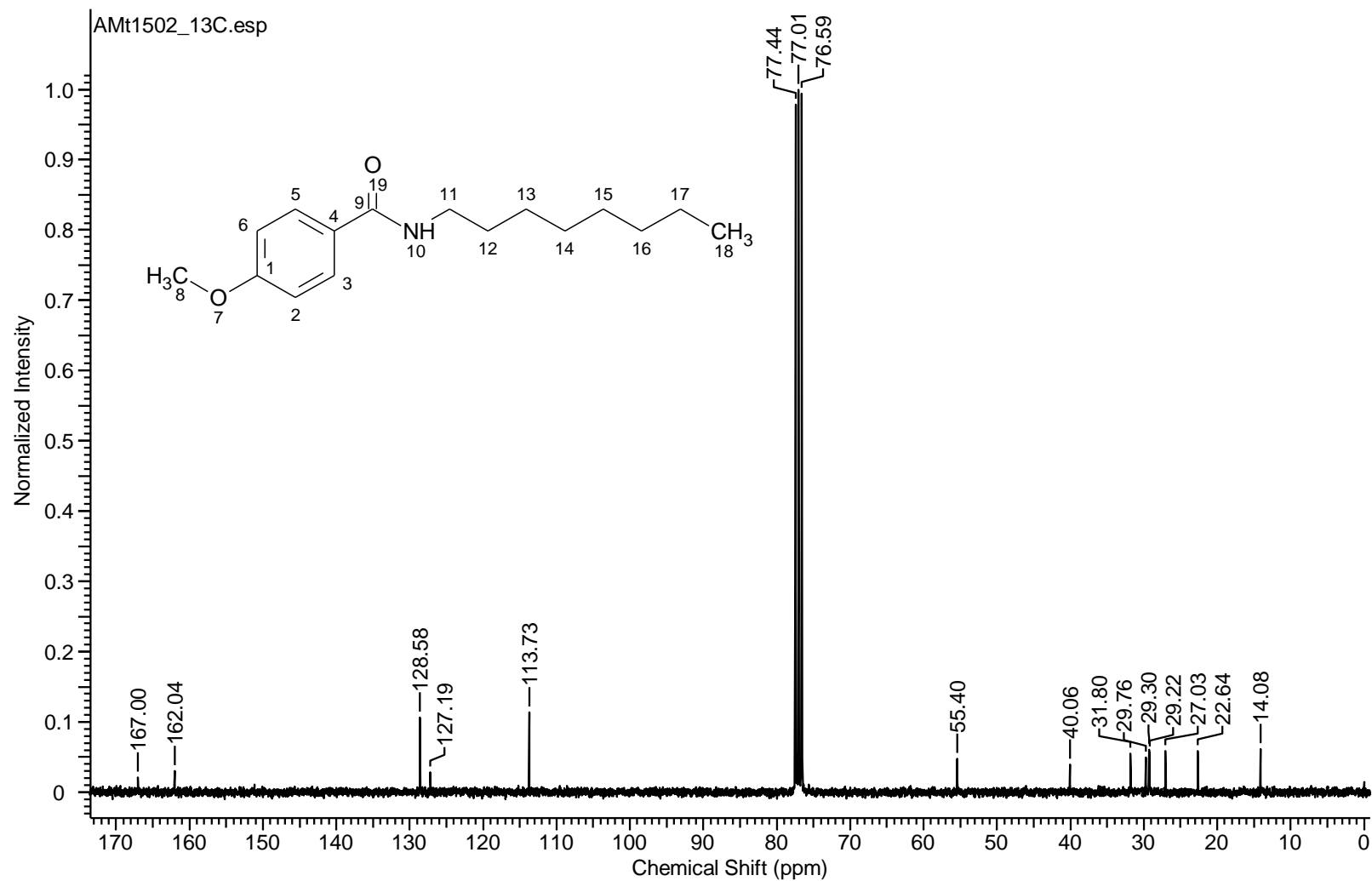
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



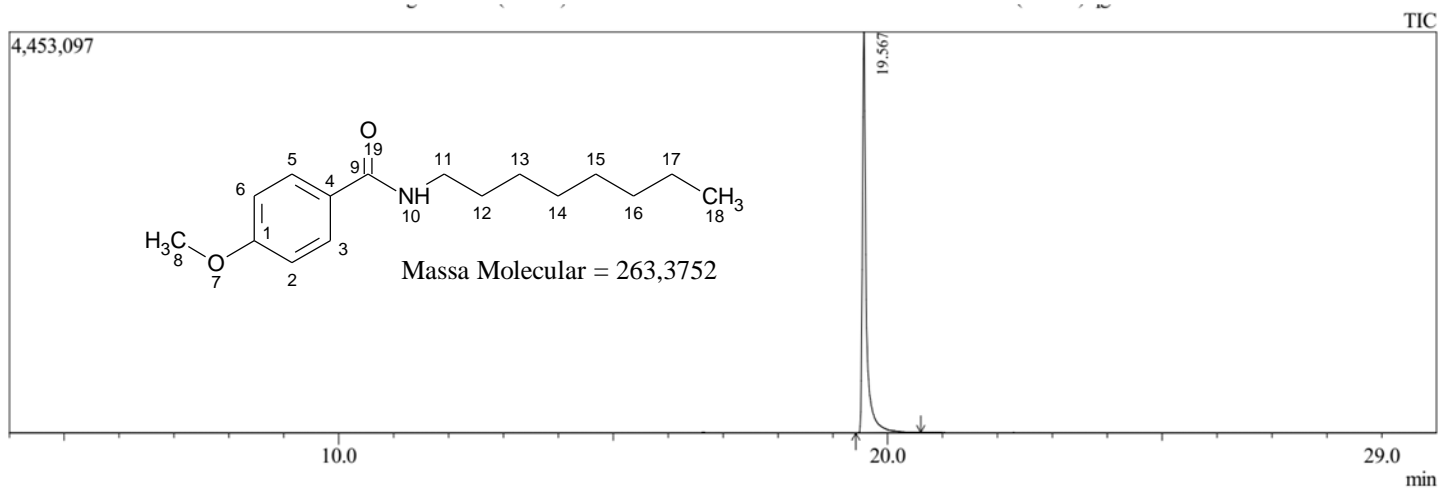
Apêndice 32:CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 15,27 min; 232 [M]⁺ (3), 214 (30), 143 (37), 133 (100), 115 (47), 105 (42), 91 (50), 77 (20), 55 (30), 41 (15).



Apêndice33: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,8 Hz, 3H, H-18); 1,22-1,41 (m, 10H, H-13/14/15/16/17); 1,55-1,66 (m, 2H, H-12) 3,46 (m, 2H, H-11); 3,85 (s, 3H, H-8); 6,02 (sl, 1H, H-10); 6,93 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-2/6); 7,73 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-3/5).



Apêndice34: ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 14,1 (C-18); 22,7 (C-17); 27,0 (C-13); 29,2 (C-12); 29,3 (C-14); 29,8 (C-15); 31,8 (C-16); 40,1 (C-11); 55,40 (C-8); 113,7 (C-2/6); 127,20 (C-3/5); 128,6 (C-4); 162,1 (C-1); 167,0 (C-9).



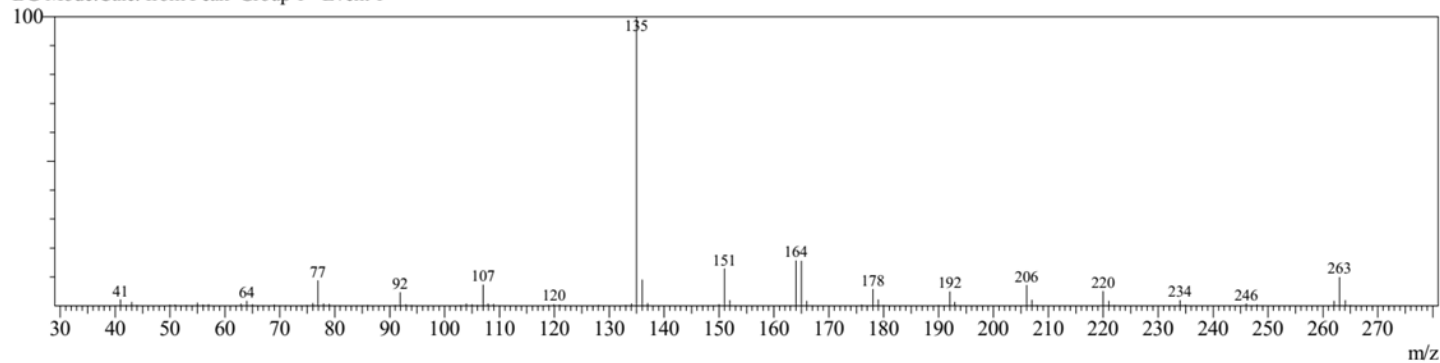
Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	19.567	19.417	20.600	21926501	100.00	4451221	100.00	4.93	MI	
				21926501	100.00	4451221	100.00			

Line#:1 R.Time:19.567(Scan#:1869)

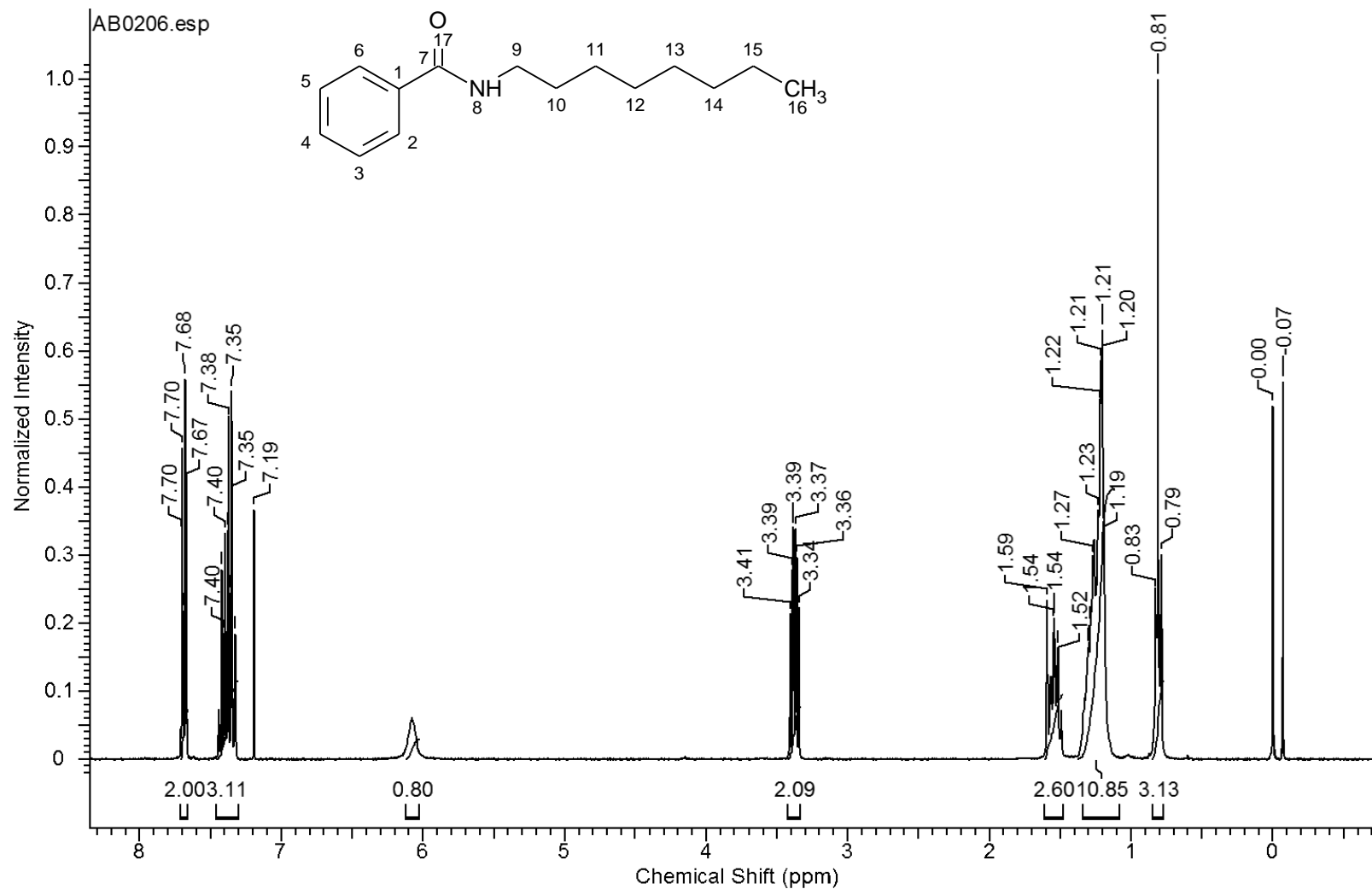
MassPeaks:98

RawMode:Averaged 19.558-19.575(1868-1870) BasePeak:135(1727183)

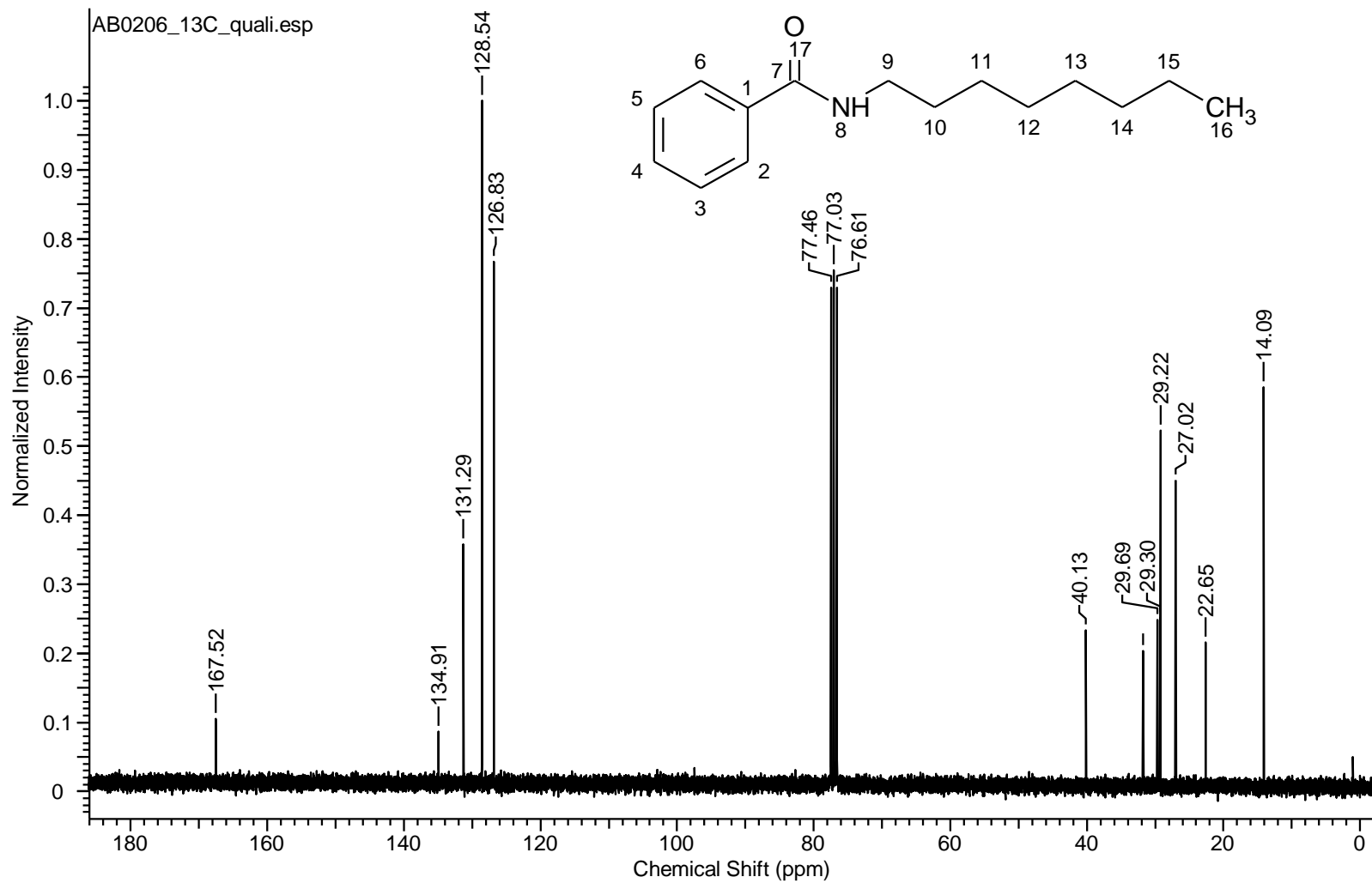
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



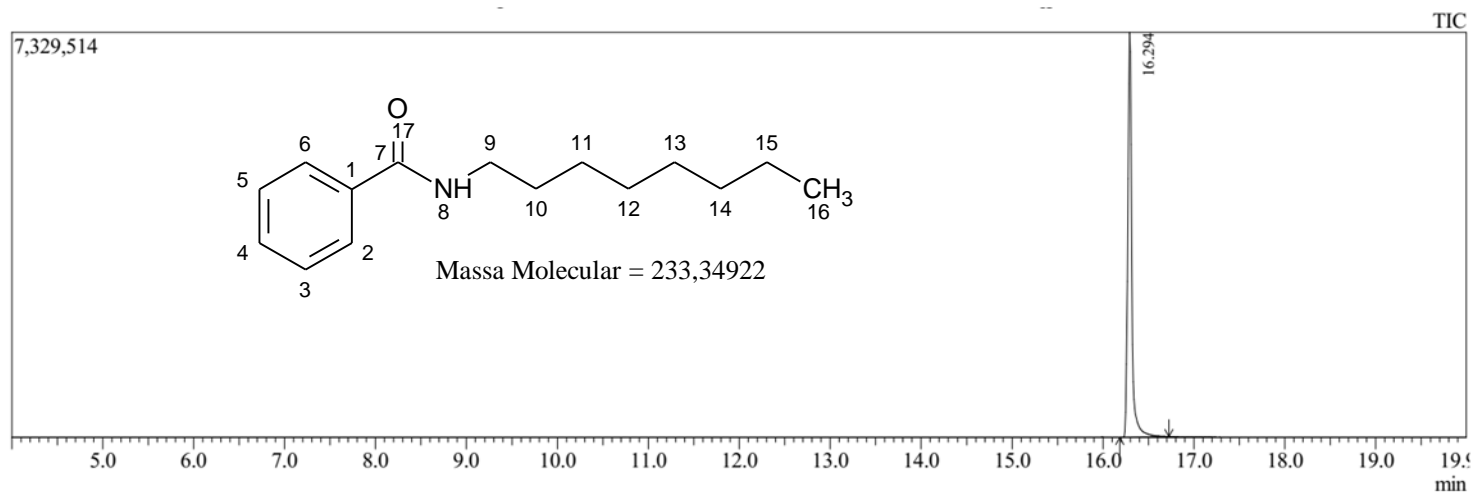
Apêndice35:CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 19,56 min; 263 [M]⁺ (12), 206 (10), 164 (17), 151 (15), 135 (100), 107 (10), 77 (12).



Apêndice36: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,81 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-16); 1,11-1,34 (m, 10H, H-11/12/13/14/15); 1,44-1,67 (m, 2H, H-10); 3,38 (dt, J = 7,2, 1,4 Hz, 2H, H-9); 6,08 (sl, 1H, H-8); 7,19-7,41 (m, 3H, H-3/4/5); 7,67-7,71 (m, 2H, H-2/6).



Apêndice37: ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 14,1 (C-16); 22,7 (C-15); 27,0 (C-11); 28,8 (C-10); 29,2 (C-12); 29,7 (C-13); 31,8 (C-14); 40,1 (C-9); 126,8 (C-3/5); 128,5 (C-2/6); 131,3 (C-1); 134,9 (C-4); 167,5 (C-7).



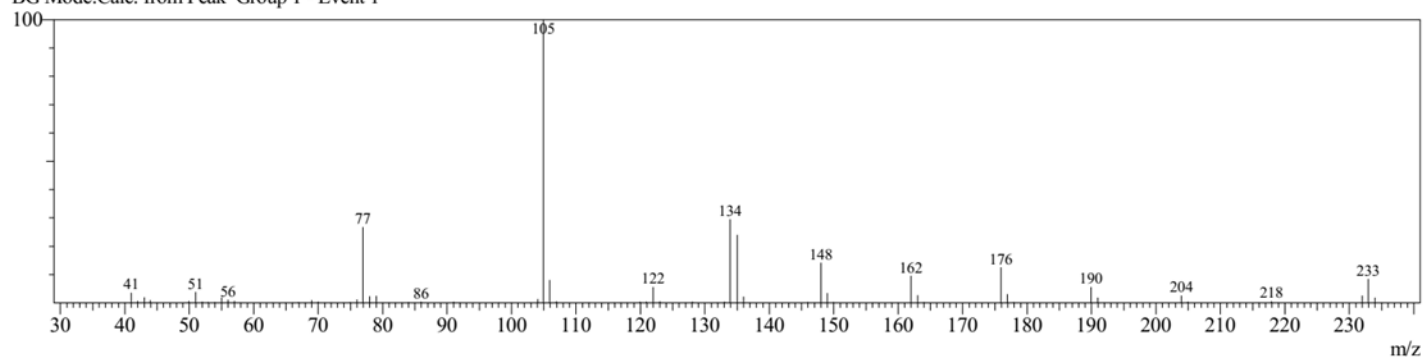
Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	16.294	16.183	16.725	22801278	100.00	7323437	100.00	3.11	MI	
				22801278	100.00	7323437	100.00			

Line#:1 R.Time:16.292(Scan#:1476)

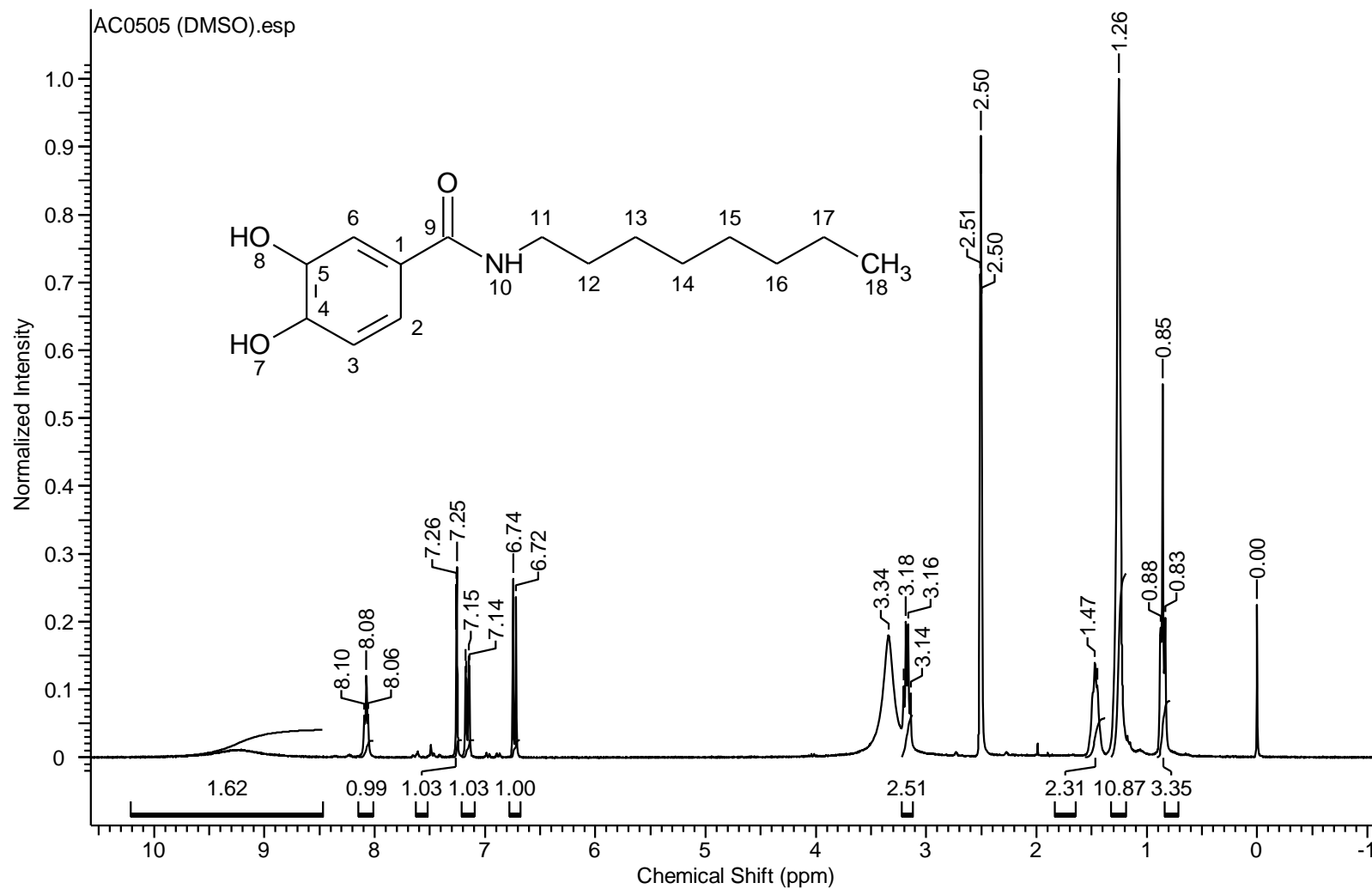
MassPeaks:99

RawMode:Averaged 16.283-16.300(1475-1477) BasePeak:105(2322601)

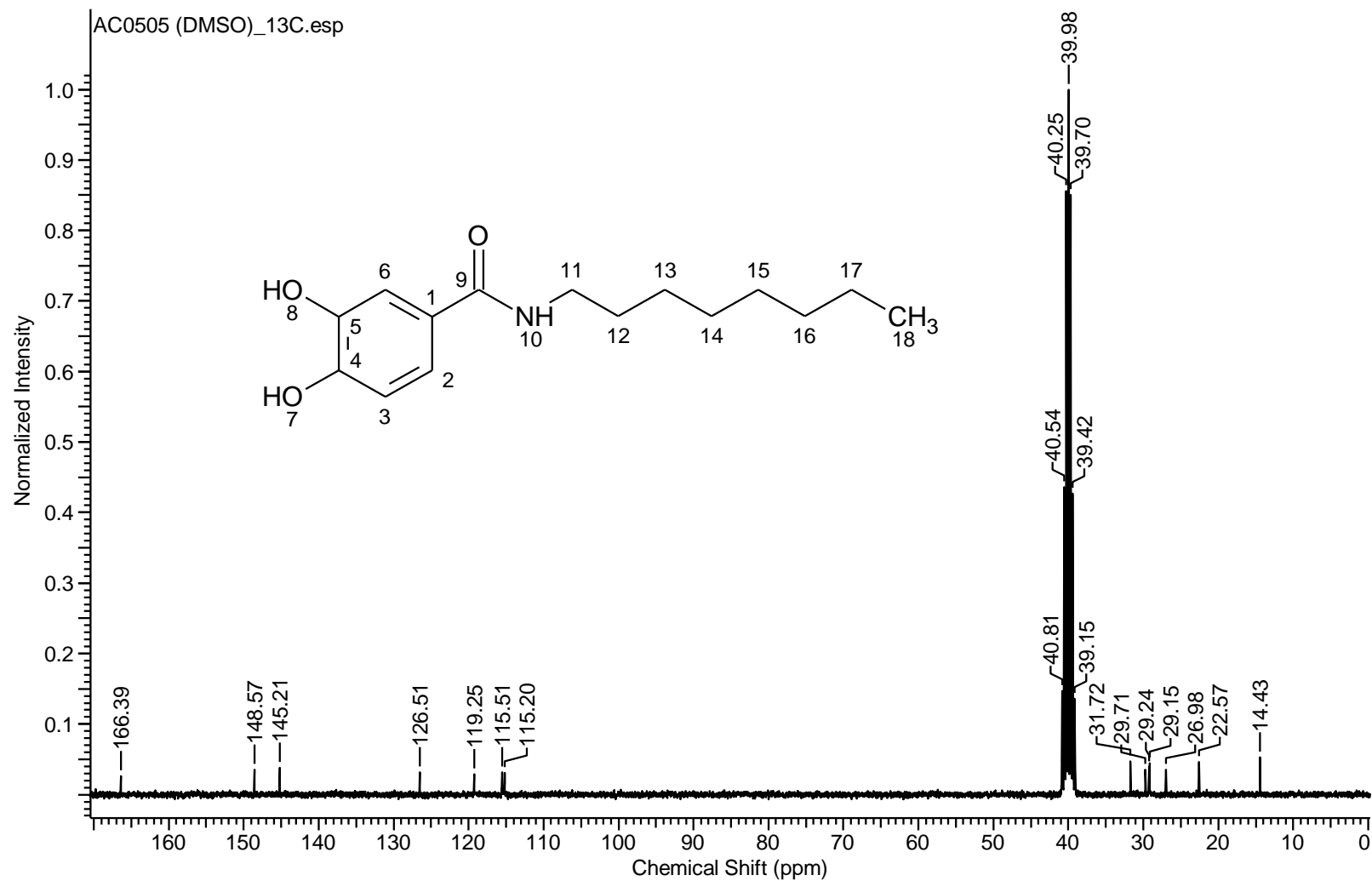
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



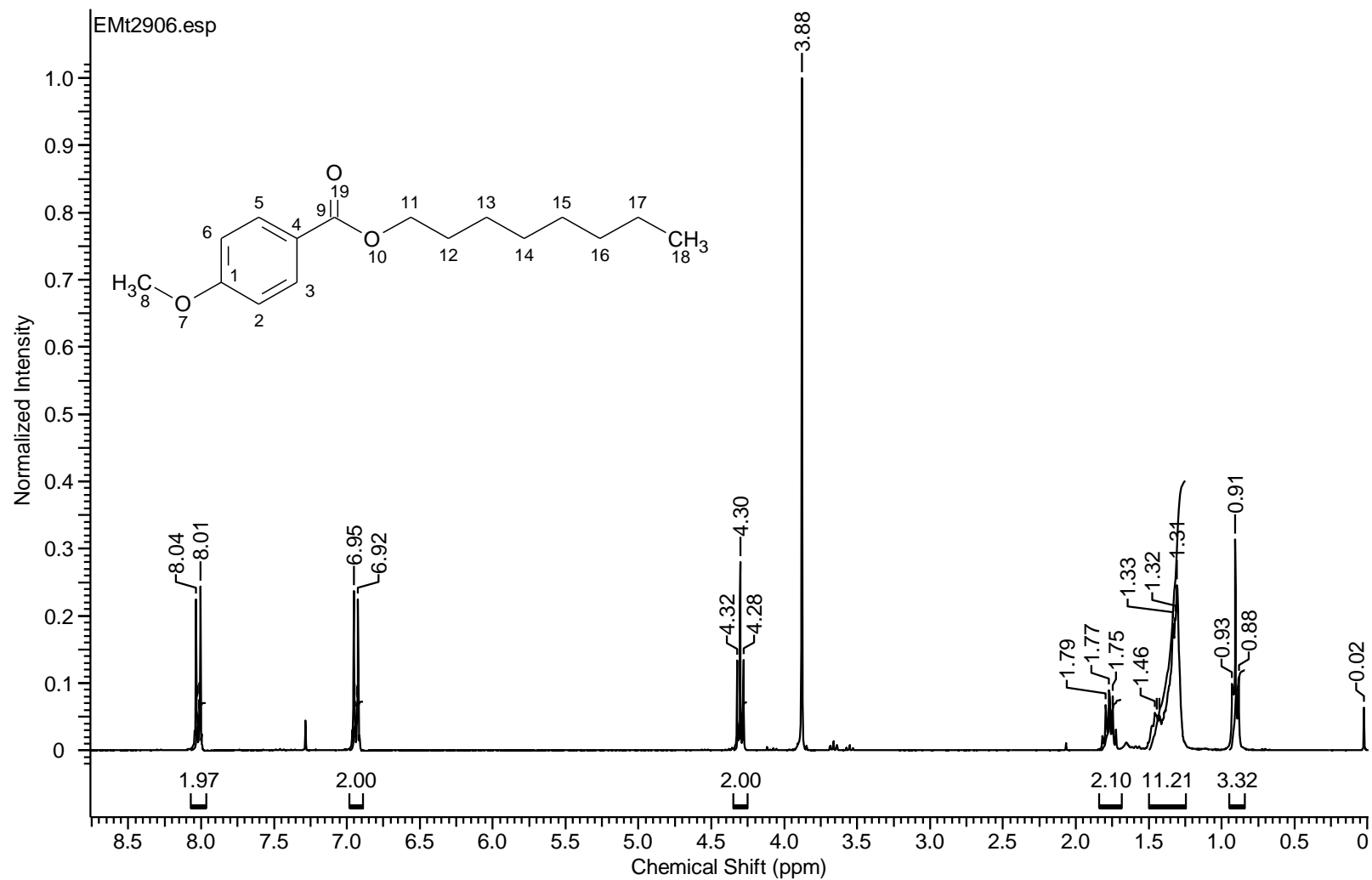
Apêndice38: CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 16,29 min; 233 [M]⁺ (9), 176 (12), 162 (10), 148 (15), 134 (30), 105 (100), 77 (27).



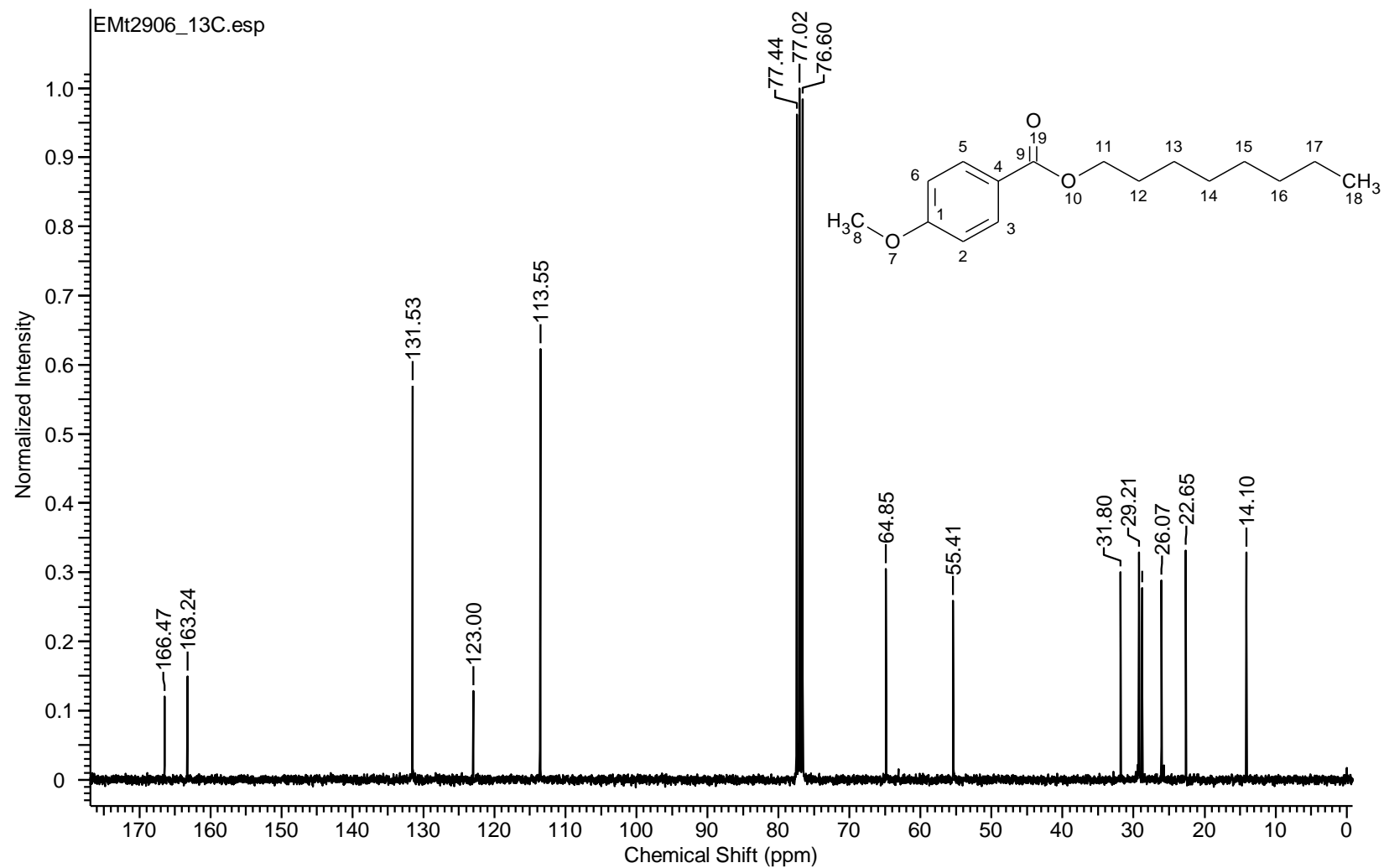
Apêndice 39: ^1H -RMN (300 MHz, DMSO, δ = ppm, TMS) 0,85 (t, J = 6,5 Hz, 3H, H-18); 1,21-1,33 (m, 10H, H-13/14/15/16/17); 1,40-1,56 (m, 2H, H-12); 3,13-3,21 (m, 2H, H-11); 6,73 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H-3); 7,16 (dd, J = 8,2, 2,1 Hz, 1H, H-2); 7,26 (d, 1H, H-6); 8,08 (t, J = 5,55 Hz, 1H, H-10); 9,40 (sl, 2H, H-7/8).



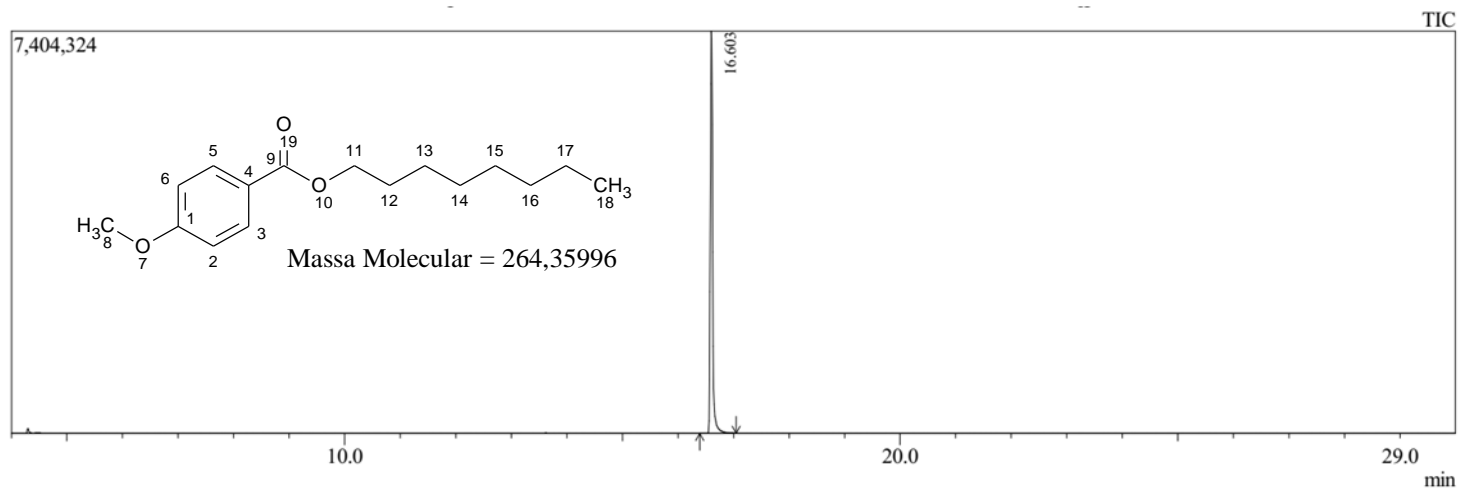
Apêndice 40: ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO, δ = ppm, TMS) 14,4 (C-18); 22,5 (C-17); 27,0 (C-13); 29,1 (C-12); 29,2 (C-14); 29,7 (C-15); 31,7 (C-16); 39,5 (C-11); 115,2 (C-3); 115,5 (C-6); 119,3 (C-2); 126,5 (C-4); 145,2 (C-5); 148,6 (C-4); 166,4 (C-9)



Apêndice41: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-18); 1,24-1,51 (m, 10H, H-13/14/15/16/17); 1,69-1,84 (m, 2H, H-12); 3,88 (s, 3H, H-8); 4,3 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H-11); 6,88-6,99 (m, 2H, H-2/6); 7,94-8,11 (m, 2H, H-3/5).



Apêndice42: ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 14,1 (C-18); 22,7 (C-17); 26,1 (C-13); 28,8 (C-12); 29,2 (C-14); 29,3 (C-15); 31,8 (C-16); 55,4 (C-8); 64,9 (C-11); 113,6 (C-2/6); 123,0 (C-4); 131,5 (C-3/5); 163,2 (C-1); 166,5 (C-9).



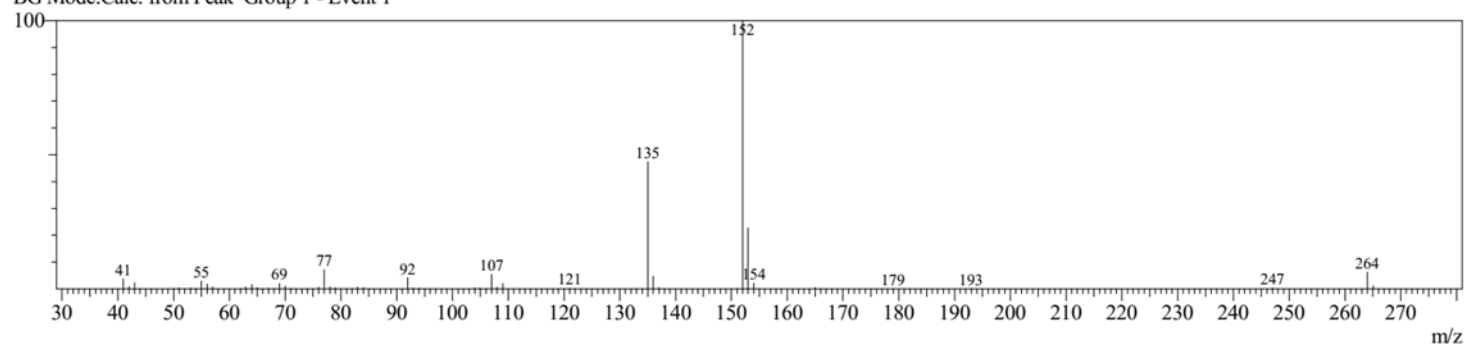
Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	16.603	16.392	17.050	22124887	100.00	7402507	100.00	2.99	MI	
				22124887	100.00	7402507	100.00			

Line#:1 R.Time:16.600(Scan#:1513)

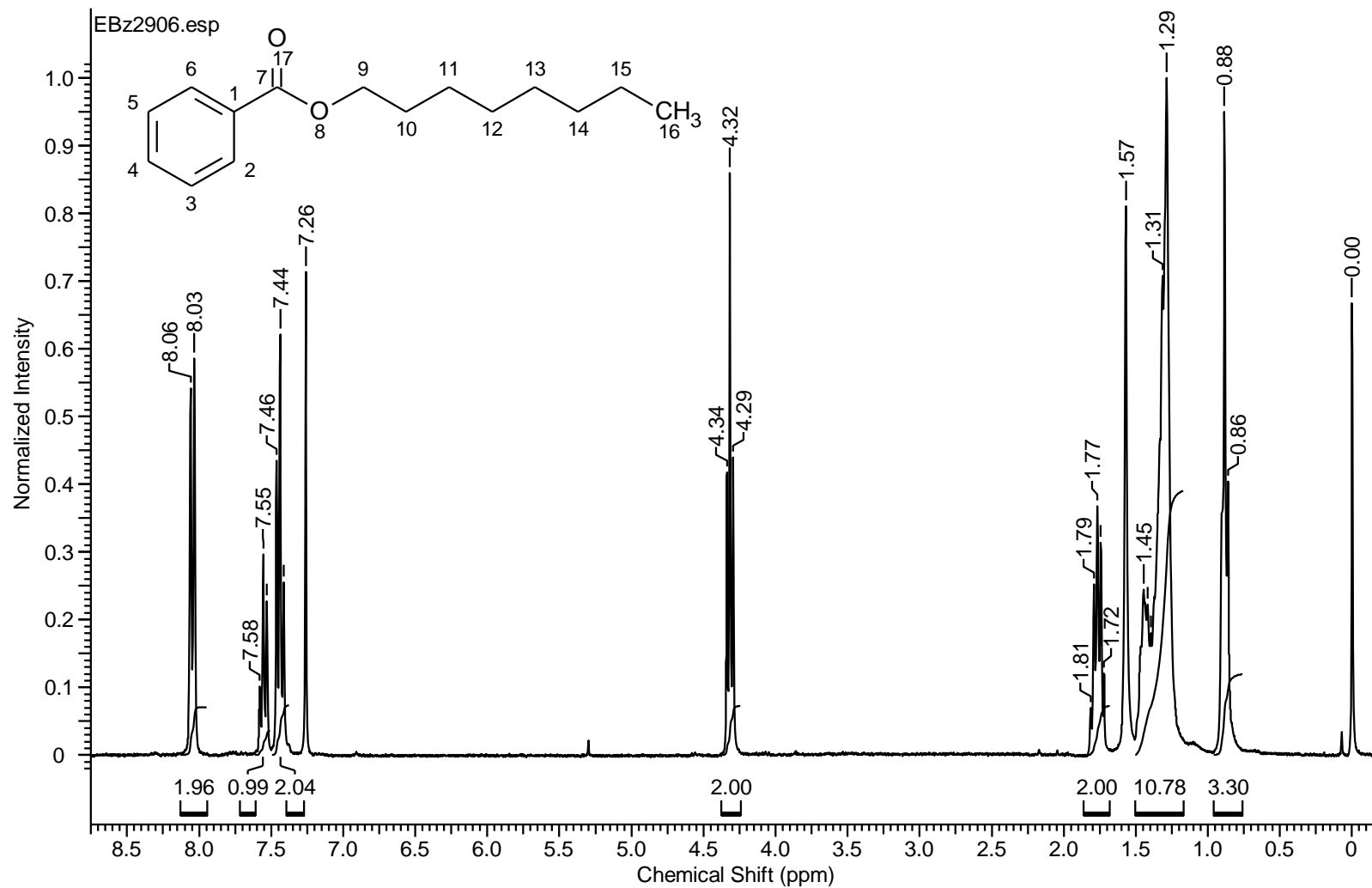
MassPeaks:79

RawMode:Averaged 16.592-16.608(1512-1514) BasePeak:152(2980763)

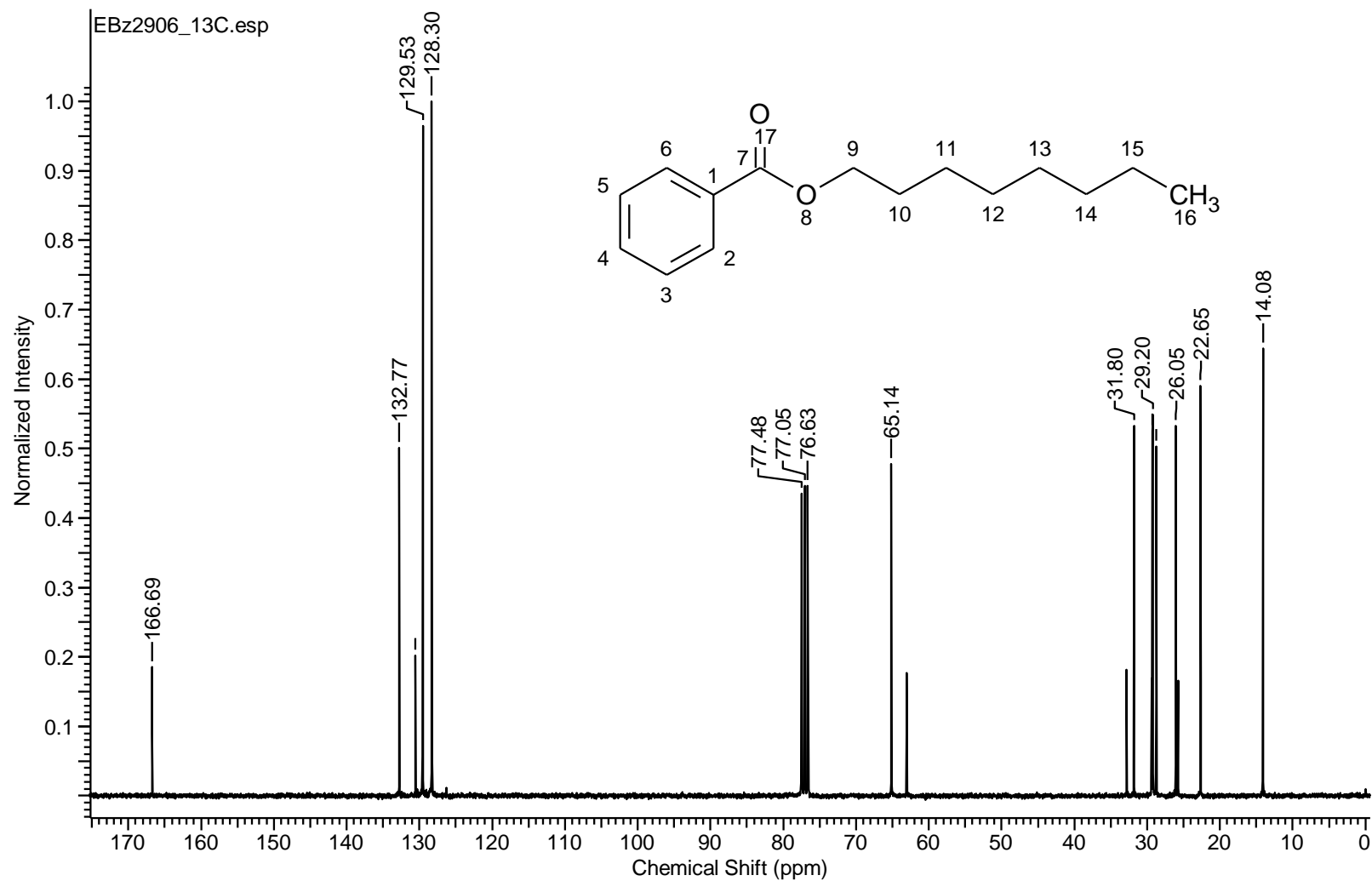
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



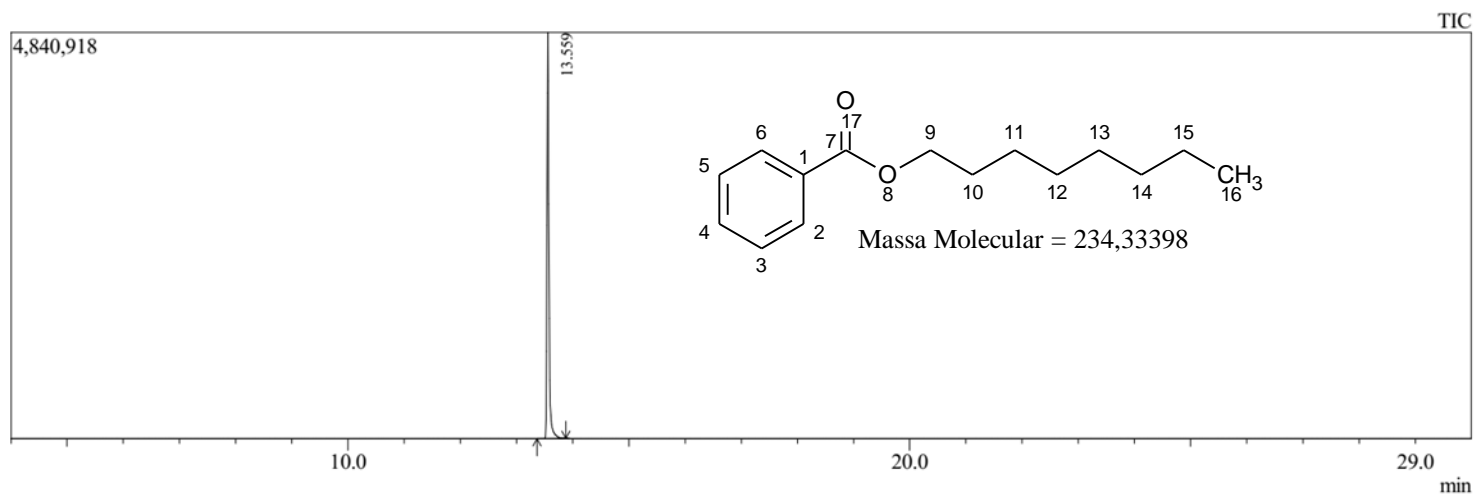
Apêndice 43 CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 16,60 min; 264 [M]⁺ (9), 153 (20), 152 (100), 135 (50), 107 (8), 77 (10).:



Apêndice44: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-16); 1,20-1,50 (m, 10H, H-11/12/13/14/15); 1,67-1,86 (m, 2H, H-10), 4,32 (t, J = 6,7 Hz, 2H, H-9); 7,35-7,49 (m, 2H, H-3/5); 7,50-7,63 (m, 1H, H-4); 7,95-8,13 (d, J = 7,2 Hz, 2H, H-2/6).



Apêndice45: ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 14,1 (C-16); 22,7 (C-15); 26,1 (C-11); 28,7 (C-10); 29,2 (C-12); 29,3 (C-13); 31,8 (C-14); 65,2 (C-9); 128,3 (C-3/5); 129,5 (C-2/6); 130,6 (C-1); 132,8 (C-4); 166,7 (C-7).



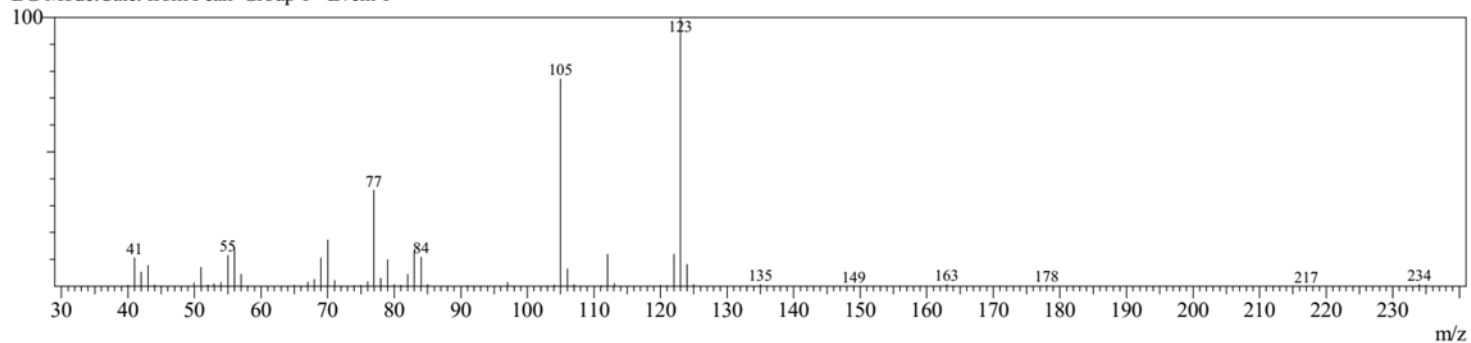
Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	13.559	13.367	13.875	11971664	100.00	4838667	100.00	2.47	MI	
				11971664	100.00	4838667	100.00			

Line#:1 R.Time:13.558(Scan#:1148)

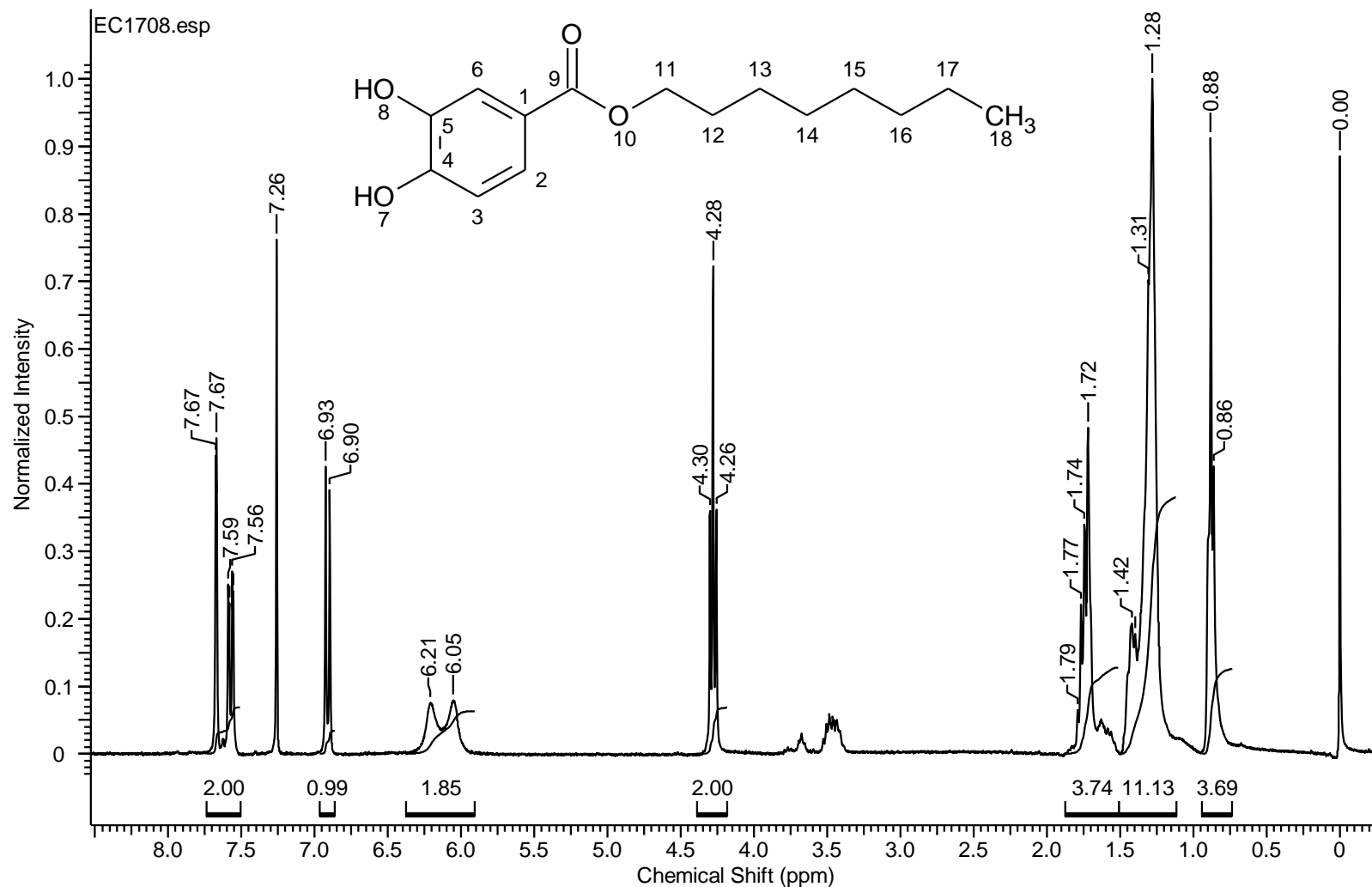
MassPeaks:68

RawMode:Averaged 13.550-13.567(1147-1149) BasePeak:123(1078908)

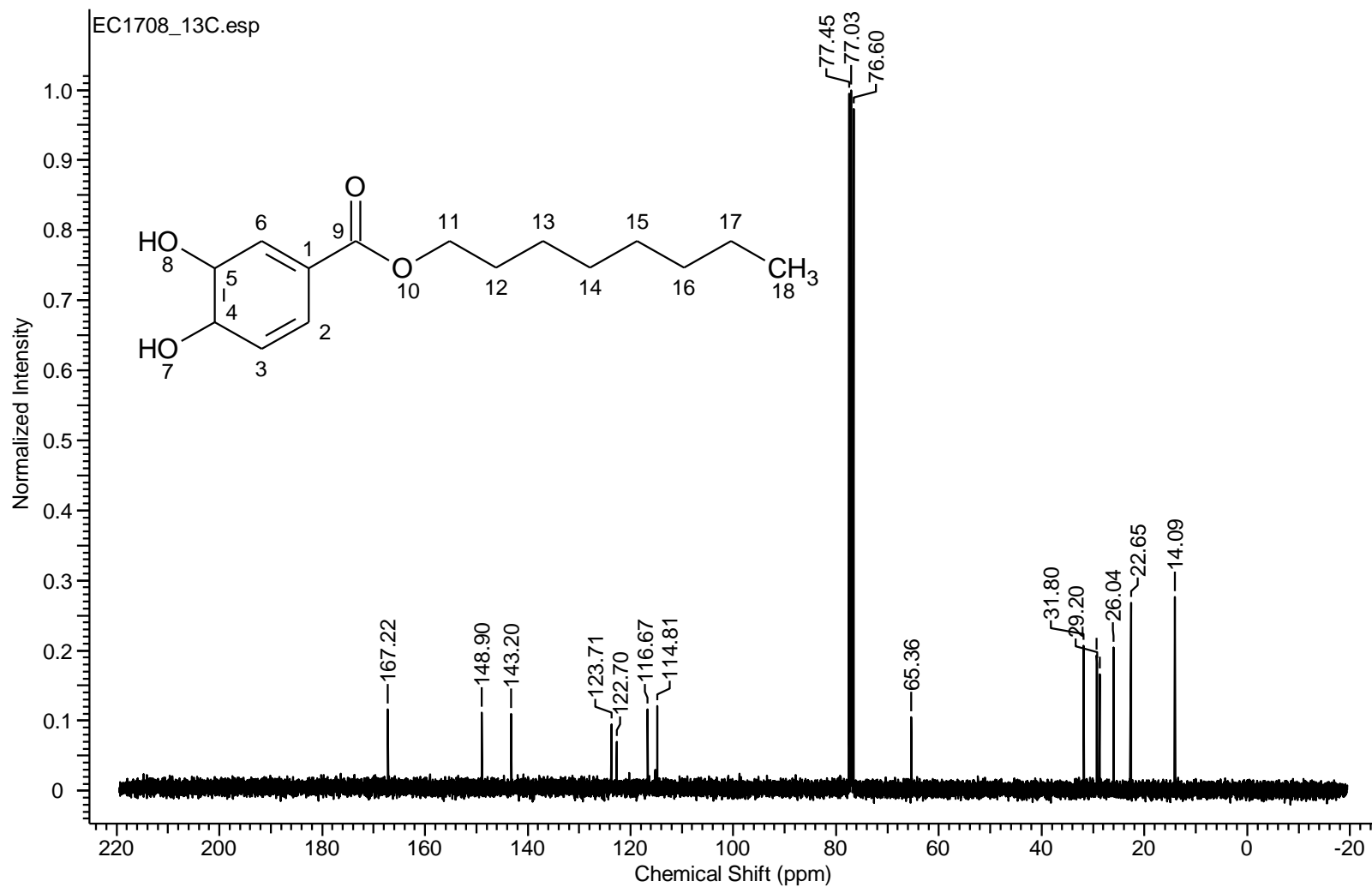
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



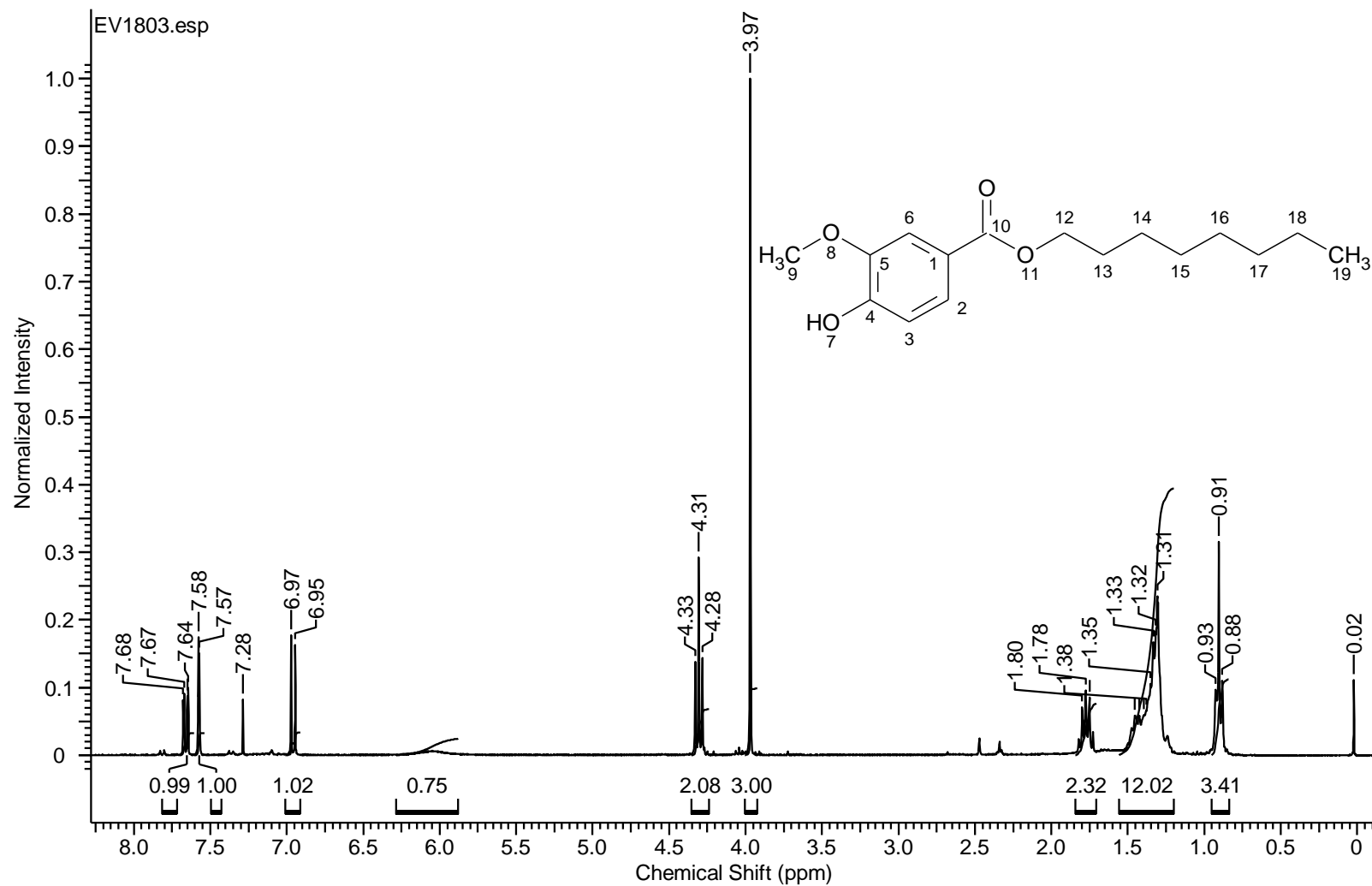
Apêndice 46:CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 13,56 min; 234 [M]⁺ (2), 123 (100), 105 (80), 84 (15), 77 (37), 55 (15), 41 (10).



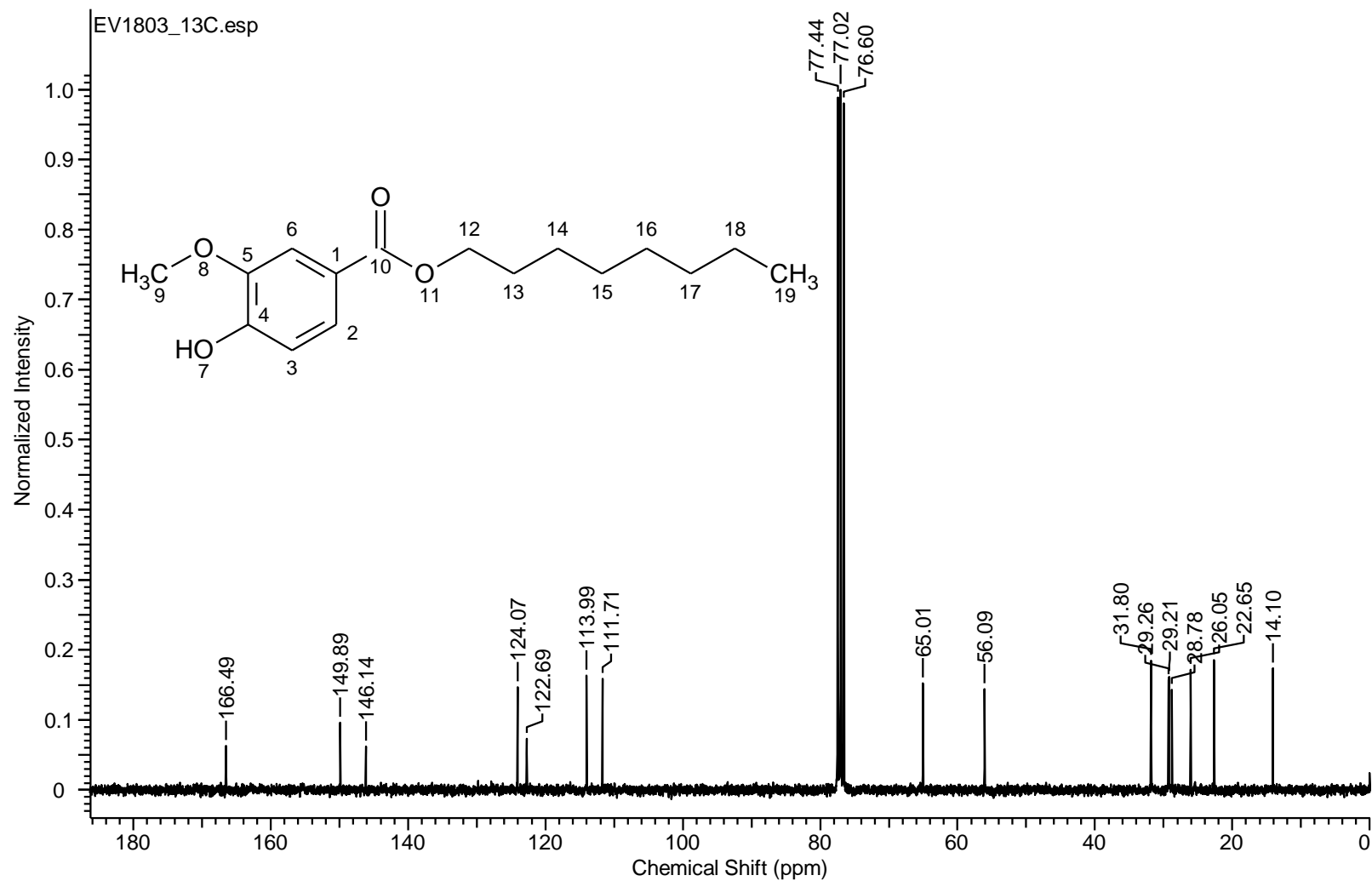
Apêndice 47: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-18); 1,18-1,49 (m, 10H, H-13/14/15/16/17); 1,64-1,84 (m, 2H, H-12); 4,28 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H-11); 5,68-6,51 (sl. 2H, H-7/8); 6,91 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H-3); 7,57 (dd, J = 8,3, 1,7 Hz, 1H, H-2); 7,67 (d, J = 1,7 Hz, 1H, H-6).



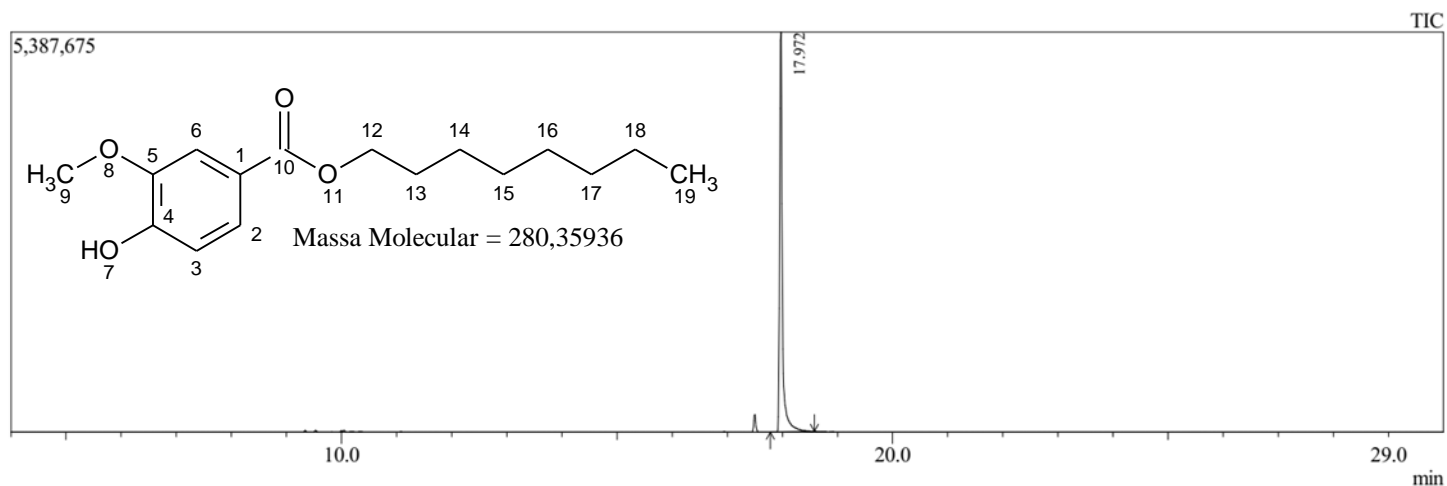
Apêndice 48: ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ = ppm, TMS) 14,1 (C-18); 22,7 (C-17); 25,9 (C-13); 28,7 (C-12); 29,2 (C-14); 29,3 (C-15); 31,8 (C-16); 65,4 (C-11); 114,81 (C-3); 116,67 (C-6); 122,7 (C-1); 123,7 (C-2); 143,2 (C-5); 148,9 (C-4); 167,2 (C-9).



Apêndice 49: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H-19); 1,21-1,54 (m, 10H, H-14/15/16/17/18); 1,70-1,83 (m, 2H, H-13); 3,97 (s, 3H, H-9); 4,31 (t, J = 6,7 Hz, 2H, H-12); 5,88-6,30 (sl. 1H, H-7); 6,96 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H-3); 7,58 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-6); 7,66 (dd, J = 8,3, 1,7 Hz, 1H, H-2).

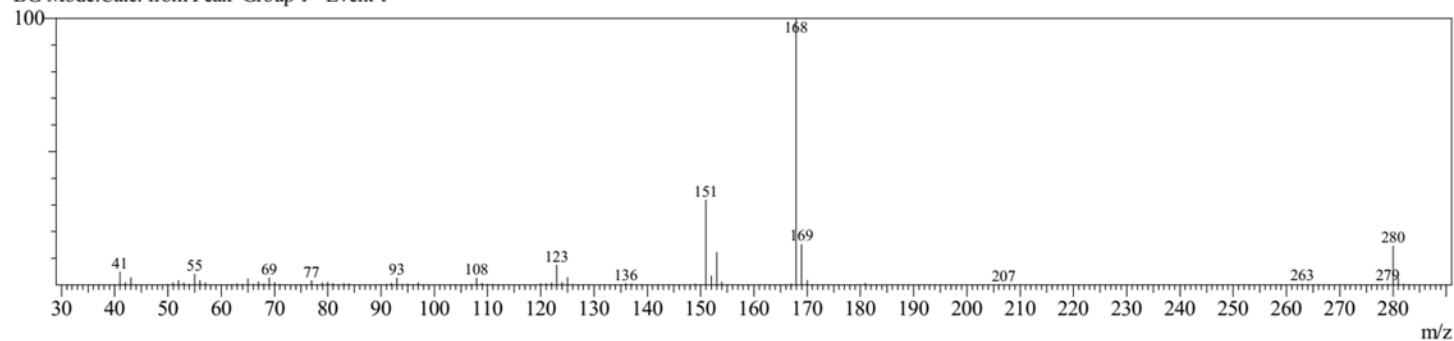


Apêndice 50: ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm, TMS) 14,1 (C-19); 22,7 (C-18); 26,1 (C-14); 28,8 (C-13); 29,2 (C-15); 29,3 (C-16); 31,8 (C-17); 56,1 (C-9); 65,0 (C-12); 111,7 (C-6); 114,0 (C-3); 122,7 (C-1); 124,1 (C-2); 146,1 (C-4); 149,9 (C-5); 166,5 (C-10).



Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	17.972	17.783	18.583	18734718	100.00	5384827	100.00	3.48	MI	
				18734718	100.00	5384827	100.00			

Line#:1 R.Time:17.975(Scan#:1678)
 MassPeaks:86
 RawMode:Averaged 17.967-17.983(1677-1679) BasePeak:168(2075454)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Apêndice 51:CG/EMBR (EI) m/z (int. rel.%): tempo de retenção 17,91 min; 280 [M]⁺ (17), 169 (15), 168 (100), 151 (30), 123 (10), 41 (5).

ANEXOS

DISCIPLINAS CURSADAS NO PERÍODO:

- Metodologia da Pesquisa Aplicada às Ciências Farmacêuticas: 4 créditos, conceito A.
- Seminários em Ciências Farmacêuticas: 3 créditos, conceito B.
- Técnicas de Planejamento e Síntese Racional de Fármacos: 4 créditos, conceito A.
- Métodos de Caracterização e Análise de Insumos Ativos Naturais e Sintéticos: 6 créditos, conceito A.
- Formas Covalentes para o Transporte de Fármacos: 4 créditos, conceito A.
- PAD – Estágio Docência: 2 créditos, aprovado.
- Atividades Complementares: 6 créditos, aprovado.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS COM APRESENTAÇÃO DE TRABALHO:

- 8th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry (2016)
- II Escola de Verão em Ciências Farmacêuticas (2017)
- III Congresso Acadêmico UNIFESP (2017)
- I Simpósio em Ciências Farmacêuticas da UNIFESP Diadema (2017)

ARTIGOS CIENTÍFICOS ELABORADOS:

- Gibbilimbol analogues as antiparasitic agents—Synthesis and biological activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania (L.) infantum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26(4), 1180-1183, 2016.
- New alkenyl derivative from *Piper malacophyllum* and analogues: Antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. **Chemical Biology & Drug Design**, v.90, 1007-1011, 2017.
- 1-[(2,3-Dihydro-1-benzofuran-2-yl) methyl]piperazines as Novel Antiinflammatory Compounds: Synthesis and Evaluation on H3R/H4R, **Chemical Biology & Drug Design**, v. 90, 317-322, 2017.
- Natural Products: Key Prototypes to Drug Discovery Against Neglected Diseases. **Current Medicinal Chemistry** (aceito).
- Synthesis and Biological Activity of New Gibbilimbol Analogues: SAR Analysis Through Group Efficiency and Chemometric Methods. (submetido)